

Titre: Transformation régiosélective du chitosane par thioacétylation pour applications biomédicales
Title:

Auteur: Vincent Pickenhahn
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Pickenhahn, V. (2016). Transformation régiosélective du chitosane par thioacétylation pour applications biomédicales [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2387/>
Citation:

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/2387/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Michael D. Buschmann, Gregory De Crescenzo, & Marc Lavertu
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

TRANSFORMATION RÉGIOSÉLECTIVE DU CHITOSANE PAR THIOACÉTYLATION
POUR APPLICATIONS BIOMÉDICALES

VINCENT PICKENHAHN

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

TRANSFORMATION RÉGIOSÉLECTIVE DU CHITOSANE PAR THIOACÉTYLATION
POUR APPLICATIONS BIOMÉDICALES

présentée : PICKENHAHN Vincent

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. FAVIS Basil, Ph. D., président

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. LAVERTU Marc, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. ZHU Julian, Ph. D., membre

M. MATEESCU Mircea Alexandru, Ph. D., membre

DÉDICACE

À mes deux étoiles, Véro et Léo.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Professeur Michael Buschmann, de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire afin que je puisse m'y épanouir, personnellement et scientifiquement. De par son esprit critique, il a su me pousser et me remettre en question dans le but de me faire progresser. J'ai appris énormément à ses côtés. Sur un plan plus personnel, je remercie également Mike d'avoir toujours répondu présent en m'accordant sa confiance lors des moments difficiles.

Je remercie tout autant le Docteur Marc Lavertu, mon co-directeur et superviseur direct, pour nos intenses séances de brainstorming devant le tableau blanc de son bureau. Tous deux armés de feutres et de café Nespresso, nous sommes finalement venus à bout de ce projet qui paraissait beaucoup plus simple qu'il ne l'a été. Marc est un passionné de la Recherche, il a non seulement la faculté de pouvoir toucher à plusieurs domaines scientifiques et d'y exceller, mais aussi de transmettre cette passion.

Je remercie également le Professeur Gregory de Crescenzo, mon second co-directeur de recherche, pour son implication au sein de ce projet. Greg m'a soutenu tout au long de ma thèse, en répondant à mes nombreuses questions et mes doutes, me permettant de voir le côté positif des choses et donc d'avancer. Je le remercie également de m'avoir permis d'assister aux réunions de son groupe, moments enrichissants qui m'ont donné le recul nécessaire dont j'avais besoin sur mon projet.

Je remercie naturellement le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada ainsi qu'ANRIS Pharmaceuticals, institutions qui ont rendu ce projet possible.

J'apporte toute ma gratitude à Sylvie Bilodeau, Antoine Hamel et Cédric Malveau appartenant au service de Résonance Magnétique Nucléaire de l'Université de Montréal (UdeM). Par la même occasion, je remercie Marie, Louiza et Karine du service de Spectrométrie de Masse de l'UdeM. Leur expertise et leur grande expérience ont fait aboutir ce projet, je suis honoré d'avoir pu collaborer avec ces personnes. Je garde une attention toute particulière pour Alexandra Furtos qui fut ma confidente dans les moments de doute et qui a toujours été disponible pour me faire remonter à la surface.

Je tiens à adresser une pensée à tous les membres du Biomaterials and Cartilage Laboratory pour avoir partagé des moments aussi intenses qu'inoubliables. Je remercie particulièrement Julie

Tremblay, notre maman à tous qui a toujours répondu avec le sourire à mes nombreuses requêtes de dernière minute (et Dieu sait s'il y en a eu!). Je remercie également Vincent Darras pour ses compétences en chimie analytique et nos nombreuses confrontations à propos de ce projet. Je témoigne également une attention particulière à Ashkan Tavakoli pour nos discussions interminables sur le Mont-Royal; Ainsi qu'à Nicolas Tran-Khanh (alias Pepito, le Roi du gâteau) pour son humour (parfois douteux!) et sa faculté à me changer les idées pendant le lunch.

J'ai également une pensée affectueuse pour mes stagiaires que j'ai encadrés lors de toutes ces années; notamment Florian Dziopa qui poursuit sa brillante carrière chez Pfizer, Jean Cacheux (alias le zoulou) qui fait maintenant son Doctorat au CNRS et Marine Grange qui est consultante chez Ayming. Je suis fier de leur succès (dont je n'ai jamais douté), moi qui ai tout mis en œuvre pour leur transmettre mes connaissances et leur inculquer ma manière de travailler.

Je remercie tout aussi intensément mes amis, les vrais, ceux qui ont soutenu mes choix et qui ont écouté attentivement mes confidences. Je pense à Matthieu qui est en Allemagne, à Anne qui est à Singapour, à Steffen qui est en Australie; mais aussi à Mr. Roland, à Jocelyn, à Yves et aux autres qui sont ici, à Montréal.

Je tiens maintenant à remercier mes familles, d'ici et d'ailleurs pour leur soutien inconditionnel : Annick et Daniel, mes parents, pour m'avoir encouragé tout au long de ce long processus que furent mes études à rallonge. Je remercie aussi ma sœur, Bilou et ma nièce Mathilde, qui s'évertuent à combler ma boîte email avec tout article ayant une quelconque connotation scientifique! Tout ce petit monde me manque terriblement, moi qui me suis expatrié outre-Atlantique, à 6000 km de chez moi, ..., de chez eux, ..., je ne sais plus exactement. Je remercie également ma famille d'ici, au Québec, Hélène et Serge, Yan et mes deux loulous (Will et Alex) qui m'ont accueilli à bras ouverts. Je ne pense pas qu'ils soient au courant d'Ô combien ils comptent pour moi et d'à quel point ils m'apportent l'équilibre dont j'ai besoin, moi qui suis loin de mes origines.

Mes dernières pensées se tournent naturellement vers Véro, celle qui partage ma vie, mes humeurs, mes choix, mes joies et mes doutes. Ma chérie, tu m'as appris à développer mes rêves, à surmonter les impossibles et à me libérer les possibles. Merci d'être là, Merci d'être toi. Je suis à la fois heureux et fier que nous soyons parents d'un petit Léo et je n'ai aucun doute que nous serons capables de lui transmettre ce dont il a besoin : des racines et des ailes.

RÉSUMÉ

Depuis le séquençage du génome, la thérapie génique est devenue une approche de traitement potentielle pour un vaste éventail de pathologies, jusqu'alors considérées comme incurables. Ce procédé consiste en l'introduction de matériel génétique sous la forme d'acide nucléique (AN) chez un patient, afin d'insérer un allèle fonctionnel des gènes déficients responsables de sa maladie, voire de modifier l'expression du ou des gènes délétères impliqués dans sa pathologie. En théorie, après leur administration les ANs doivent pénétrer dans la circulation sanguine et rentrer à l'intérieur des cellules du tissu désiré afin d'y exercer leur activité thérapeutique. Dans la pratique, l'administration d'ANs n'est pas si aisée car ces macromolécules polyanioniques sont extrêmement sensibles aux enzymes contenues dans le plasma sanguin et leurs charges négatives limitent leur passage au travers des membranes biologiques. Ainsi, l'utilisation de transporteurs ou vecteurs s'est avérée nécessaire pour protéger les ANs dans la circulation et de leur permettre de traverser les barrières cellulaires. Au sein de notre laboratoire (Biomaterials and Cartilage Laboratory, Polytechnique Montréal), le chitosane (CS) qui est un polymère naturel a été choisi en tant que vecteur d'ANs pour sa biocompatibilité et ses caractères biodégradables et non-toxiques.

Le CS, en tant que polymère cationique, se complexe avec l'AN *via* interactions électrostatiques pour former des polyplexes. Ces polyplexes portent une charge globale positive, ce qui leur permet dans des conditions *in vitro*, de conserver une stabilité colloïdale, de passer facilement les membranes cellulaires, de pouvoir sortir de l'endosome et de libérer le matériel génétique dans le cytoplasme. Cependant, lors de leur administration *in vivo*, les polyplexes sont soumis au pH sanguin (pH 7.4), aux fortes concentrations en sels (150 mM) et à l'adsorption des protéines plasmatiques (PPL). Il en résulte une agglomération irréversible de ces nanostructures, suivie de leur reconnaissance accrue par le système réticulo-endothélial résultant à leur élimination prématurée de la circulation sans pouvoir y exercer un effet thérapeutique. Une solution pour augmenter la demi-vie des polyplexes CS-AN *in vivo* est d'y ajouter un bouclier hydratant sur la surface, à savoir une couche de poly(éthylène glycol) (PEG). Le PEG en tant que polymère extrêmement hydrophile et non-interpénétrant, aura ainsi la capacité d'assurer une stabilité colloïdale aux polyplexes, de limiter l'adsorption des PPL sur leur surface et donc de prolonger leur temps de circulation dans l'organisme.

Parmi les stratégies de PEGylation de polyplexes existantes, notre choix s'est porté sur la formation de structures interpolyélectrolytes ayant un comportement micellaire, les « Block ionomer complexes » (BICs). Les BICs seraient formés par auto-assemblage via la complexation d'ANs et de copolymère en bloc CS-b-PEG, le cœur des particules devenant ainsi hydrophobe entouré d'une couche protectrice de PEG hydrophile. Une telle structure à base de CS n'a pas encore été proposée dans la littérature et permettrait d'ouvrir de nouvelles voies au CS en tant que système de livraison. De ce fait, l'objectif principal de ce projet de Doctorat est de former un copolymère en blocs CS-b-PEG et de l'engager dans la formation de BICs.

Les chimies de conjugaison de l'extrémité terminale du CS ont été rarement exploitées dans la littérature. Bien que le dernier monomère réducteur du CS offre une fonction aldéhyde par ouverture de cycle, la façon la plus aisée de générer des extrémités réactives de CS est de procéder à sa dépolymérisation à l'acide nitreux (HONO), produisant ainsi une unité 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit), portant également une fonction aldéhyde. Cependant, la littérature suggère que cette fonction est majoritairement présente sous sa forme hydratée et non-réactive, dite *gem*-diol, en conditions aqueuses à faible pH. Dans des études similaires, la chimie click-oxime a été utilisée avec plus ou moins de succès afin de réagir avec de tels aldéhydes, mais l'addition d'un co-solvant ainsi que d'agents chimiques additionnels sont nécessaires à l'obtention d'une structure stable. Dans ce projet, la disponibilité de la forme réactive de l'aldéhyde terminal du CS traité au HONO ainsi que sa réactivité envers les thiols en conditions acides ont été évaluées. En effet, ces conditions (aqueuses à faible pH) sont nécessaires à la solubilisation du CS de par la protonation de ses amines; ses dernières étant chargées, elles ne seront donc pas réactives envers l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit. Dans ces conditions, le choix des thiols s'est imposé de par leur plus haute réactivité envers les carbonyles que leurs homologues hydroxyles ou amines. Des études de spectrométrie de masse (LC-MS) et de résonance magnétique nucléaire (^1H et DOSY NMR) ont confirmé la thioacetylation régiosélective de l'aldéhyde terminal du CS avec des taux de conversion variant de 55 à 70% dépendamment de la molécule engagée. Il a également été démontré que la stabilisation de l'intermédiaire hémithioacétal en thioacétal est facilitée en lyophilisant le milieu réactionnel. En tant qu'application directe de cette nouvelle chimie de conjugaison, la PEGylation en bout de chaîne du CS a été effectuée avec succès par thioacetylation. Les copolymères, notés CS-b-PEG₂, ont ensuite été engagés avec de l'ADN plasmidique pour former des polyplexes ayant une structure micellaire. En effet, des images de microscopie

électronique ont révélé que les nanoparticules obtenues ont une morphologie uniformément sphérique alors qu'un mélange de bâtonnets/torroïdes/sphères est en général obtenu avec du CS non-modifié.

En dépit du fait que l'objectif principal de ce projet ait été atteint à ce niveau, le procédé de thioacétylation régiosélective décrit ci-dessus demeure incompatible avec l'introduction de groupements sensibles à l'hydrolyse acide et son efficacité est limitée par l'encombrement stérique occasionné par le fait que deux attaques de thiols successives au même endroit sont nécessaires à l'obtention d'une structure stable, le thioacétal. De plus, la purification des CS PEGylés s'est avérée extrêmement difficile, notamment à cause de la polydispersité du CS utilisé dans la réaction.

Nous avons alors développé une autre approche de modification régiosélective de l'extrémité du CS par thioacétylation, impliquant la conjugaison d'un linker portant trois fonctions thiols. Ce linker trivalent, le Triskelion, a été conçu pour activer le mannose terminal du CS (M-Unit) par une de ses deux extrémités portant un crochet-thiol au travers d'un mécanisme intramoléculaire. Son extrémité thiol restante, situé au bout d'un espaceur, sera engagée *a posteriori* avec d'autres espèces réactives aux thiols. La synthèse en trois étapes du Triskelion a été effectuée avec succès et sa réactivité avec la M-Unit a été étudiée de manière semi-quantitative par LC-MS, révélant la prédominance d'un mécanisme de thioacétylation intramoléculaire (89%). Cette dérivatisation régiosélective a également été accomplie sur l'aldéhyde terminal de chaînes de CS avec plus de 85% d'efficacité, tel que confirmé par spectroscopie RMN (^1H et DOSY). En tant qu'application finale de ce nouveau procédé, la réactivité de l'extrémité thiol des conjugués CS-b-Triskelion a été démontrée par leur conjugaison chimiosélective sur la surface de billes magnétiques, par déplacement de ponts disulfures avec 50% d'efficacité.

La thioacétylation et plus particulièrement l'activation terminale du CS avec le Triskelion ouvrent de nouvelles perspectives dans le domaine des applications biomédicales, spécialement au niveau des modifications de surfaces et autres formations de copolymères au travers de la formation de liens labiles et/ou non-labiles.

ABSTRACT

Gene therapy, as potential treatment of incurable pathologies, arose from the sequencing of the human genome several decades ago. This process is based on the introduction of nucleic acids (NAs) into a patient, to replace or to modify the expression of an abnormal gene which causes a particular disease. Theoretically, after their administration, such NAs would be able to circulate within the blood vessels until their entrance into the cells of a specific tissue to observe a therapeutic effect. Practically, as highly sensitive polyanionic macromolecules, NAs are easily degraded by plasma components and their negative charges also limit their transit through biological membranes. These limitations can be overcome using carriers, also named vectors, that protect NAs through the circulation while ensuring their internalization into the desired cells. In our laboratory (Biomaterials and Cartilage Laboratory, Polytechnique Montréal), chitosan (CS) has been chosen for gene vectorization since it affords biocompatibility, biodegradability and low toxicity.

As a natural cationic polymer, CS can interact with NA through electrostatic interactions forming polyplexes. In the case of *in vitro* assays, these polyplexes which carry a positive net charge, are sterically stable, can easily enter cells and their genetic material can be released within the cytoplasm. However, in the case of *in vivo* assays, the polyplexes are subject to the physiological pH (pH 7.4), to high salt concentrations (150 mM) and to the adsorption of plasmatic proteins (PIPs). Thus, the polyplexes irreversibly aggregate and are easily recognized by the reticuloendothelial system, resulting in their early elimination from the body prior carrying out any therapeutic effect. PEGylation was proposed as a solution to increase the polyplexes life-time *in vivo*, by recovering their surface with poly(ethylene glycol) (PEG), forming a hydrating shield. Indeed, PEG is a non-penetrating and highly hydrophilic biocompatible polymer that affords colloidal stability to polyplexes and that can limit PIPs adsorption onto their surface, hence prolonging their circulation time within the blood vessels.

Among all the polyplexes PEGylation strategies described in the literature, we opted for the formation of interpolyelectrolyte complexes having a micellar structure, namely block-ionomer complexes (BICs). The BICs are formed by self-assembly upon electrostatic interactions between NAs and PEGylated CS block-copolymers, namely CS-b-PEG, forming a hydrophobic core surrounded by a protective hydrophilic PEG layer. Such structure has not been proposed with CS

so far and may offer new perspectives to CS as gene-delivery system. Thus, the principal objective of the thesis herein is the formation of a CS-b-PEG block-copolymer that could be engaged with NAs in BICs formation.

Chitosan end-group chemistry is a conjugation strategy that has been minimally exploited in the literature to date. Although the open-chain form of the CS reducing extremity bears a reactive aldehyde moiety, the most common method to generate a reactive end-group on CS is nitrous acid (HONO) depolymerization, which produces a 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) bearing also an aldehyde moiety. However, the availability of the latter might be low, since previous literature suggests that its hydrated and non-reactive form, namely the *gem*-diol form, is predominant in acidic aqueous conditions. Oxime-click chemistry has been used to react on such aldehydes with various degrees of success, but the use of a co-solvent and additional chemical reagents remain necessary to obtain the desired and stable covalent linkage. In this study, we have assessed the availability of the aldehyde reactive form on chitosan treated with HONO. We have also assessed its reactivity towards thiol-bearing molecules in acidic conditions where CS amino groups are fully protonated and thus unreactive towards aldehyde. LC-MS and NMR spectroscopy methods (^1H and DOSY, respectively) confirmed the regioselective thioacetylation of the reactive aldehyde with conversion rates between 55 and 70% depending on the thiol molecule engaged. The stabilization of the hemithioacetal intermediates into the corresponding thioacetals was also found to be facilitated upon freeze-drying of the reaction medium. The PEGylation of the CS M-Unit aldehyde by thioacetylation was also performed as a direct application of the proposed conjugation approach. CS-b-PEG₂ block copolymers were successfully synthesized and were used to prepare BICs with plasmid DNA, as revealed by their spherical morphology *vs.* the rod-like/globular/toroidal morphology observed for polyplexes prepared using native unmodified CS.

Even though the main objectives of this project were reached at this step, the regioselective thioacetylation process described above is incompatible with acid-labile substituents and the conversion efficiency of CS end-groups could be limited by the size of the thiol species engaged in the reaction, mainly by steric hindrance since two substituents are required to obtain the stabilized thioacetal derivative. Moreover, the purification of such PEGylated CS remained challenging, mainly due to the high polydispersity of the CS chains used as starting material.

In a further study, we developed a novel CS end-group thioacetylation approach relying on a novel and regioselective linker that bears three thiol moieties. This trivalent linker, referred to as the Triskelion, was specifically designed for activation of CS 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) end-group and consists of a thiol-hook for efficient aldehyde conjugation through an intramolecular reaction and of a thiol-tail that remains available for subsequent end-group functionalization with any thiol-reactive species. The chemical synthesis of this linker afforded the desired material with high yields over three steps. The *in situ* intramolecular thioacetylation process between the Triskelion linker and 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit, monomeric) was assessed by semi-quantitative LC-MS studies, revealing that the corresponding intramolecular thioacetal largely predominates (89%). This regioselective derivatization was also performed onto M-Unit CS aldehydes and the desired CS-b-Triskelion conjugates were obtained with functionalization degrees over 85%, as confirmed by NMR spectroscopy (^1H and DOSY). As a final application and to assess the CS-b-Triskelion thiol-tail reactivity, such conjugates were successfully engaged with thiol-reactive magnetic beads into disulfide bond displacement with 50% efficiency.

The proposed thioacetylation process, as well as the CS terminal activation with the Triskelion linker opens new perspectives for biomedical applications, especially brush-like surface modifications and other copolymers formation through disulfide linkages or Michael type additions.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	III
REMERCIEMENTS.....	IV
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT.....	IX
TABLE DES MATIÈRES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVI
LISTE DES FIGURES	XVIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXXI
LISTE DES ANNEXES	XXXVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Cadre de la recherche.....	1
1.2 Objectifs.....	3
1.3 Approche envisagée	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 La thérapie génique.....	4
2.1.1 Les acides nucléiques.....	4
2.1.2 Les contraintes de la thérapie génique	5
2.1.3 Les vecteurs utilisés en thérapie génique.....	6
2.2 Le chitosane	11
2.2.1 Origines.....	11
2.2.2 Préparation	12
2.2.3 Caractérisation physico-chimique.....	13
2.2.4 Modifications chimiques.....	15

2.3	Vectorisation d'acides nucléiques par le chitosane	17
2.3.1	Propriétés physico-chimiques et caractérisation des polyplexes	17
2.3.2	Devenir des polyplexes <i>in vivo</i> après administration.....	21
2.3.3	Avantages et Limitations des polyplexes chitosane-acides nucléiques	27
2.4	Poly(éthylène glycol) et nanoparticules PEGylées	29
2.4.1	Propriétés physico-chimiques du PEG.....	29
2.4.2	Nanoparticules PEGylées et résistance aux protéines de reconnaissances.....	31
2.4.3	Nanoparticules PEGylées et stabilité colloïdale	34
2.4.4	Innocuité des nanoparticules PEGylées	36
2.5	Formation des polyplexes chitosane – acide nucléique PEGylées	37
2.5.1	PEGylation de surface.....	38
2.5.2	Copolymères à greffons	38
2.5.3	Copolymères en blocs.....	40
2.5.4	Polyplexes formés à partir de copolymères CS-PEG	45
CHAPITRE 3 DÉMARCHÉ DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT.....		50
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : REGIOSELECTIVE THIOACETYLATION OF CHITOSAN END-GROUPS FOR NANOPARTICLE GENE DELIVERY SYSTEMS		55
4.1	Abstract	55
4.2	Introduction.....	57
4.3	Materials and Methods.....	62
4.3.1	Reagents, materials	62
4.3.2	Aldehyde availability	62
4.3.3	Thiol reactivity towards M-Unit CS aldehyde.....	63
4.3.4	CS-b-PEG ₂ block-copolymer.....	72

4.4	Results and discussion	74
4.4.1	Aldehyde availability	74
4.4.2	Mechanisms of conjugation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) and thiol-bearing molecules	76
4.4.3	M-Unit chitosan HCl salt reactivity	80
4.4.4	Effective CS PEGylation by thioacetylation of the CS M-Unit aldehyde	85
4.5	Conclusions.....	89
4.6	Acknowledgements.....	92
CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : REGIOSELECTIVE CHITOSAN END-GROUP ACTIVATION: THE TRISKELION APPROACH		93
5.1	Abstract	93
5.2	Introduction.....	95
5.3	Materials and methods	99
5.3.1	Reagents, Materials.....	99
5.3.2	Trivalent linker – Triskelion synthesis	99
5.3.3	Intramolecular thioacetylation of CS end-group studies involving molecules bearing a thiol-hook.....	101
5.3.4	CS-b-Triskelion conjugation to magnetic microparticles	106
5.4	Results and discussion	107
5.4.1	The pure trivalent linker was efficiently synthesized in 3 steps	107
5.4.2	The 2,5-anhydro-D-mannose aldehyde derivatization in MeOH with molecules bearing a thiol-hook leads to the intramolecular thioacetal as major product	109
5.4.3	Efficiency of M-Unit CS HCl derivatization with molecules bearing a thiol-hook	113
5.4.4	The terminally activated CS efficiently and selectively react with thiol reactive surface	117

5.5	Conclusions.....	121
5.6	Acknowledgments.....	122
CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE.....		123
6.1	Omniprésence du <i>gem</i> -diol en extrémité du CS	123
6.2	La thioacetylation de l'aldéhyde de la M-Unit nécessite deux attaques de thiols successives	124
6.3	La synthèse du copolymère en blocs CS-b-PEG ₂ a permis la formation de BICs.....	126
6.4	Activation de l'extrémité terminale du CS	128
CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....		131
BIBLIOGRAPHIE.....		135
ANNEXES		156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Liste non-exhaustive des polymères cationiques destinés à la livraison d'ADN médicament.	10
Table 4.1 : Expected product (Figure 4.6) proportions as deduced from LC-MS analyses. Percentages represent the relative proportion of expected final molecules resulting from each conjugation that were implemented in triplicates ($N \geq 3 \pm \text{SD}$): (A) hemithioacetal intermediate, (B) oxathiolane (for β -mercaptoethanol only), (C) thioacetal, (D) α,β -unsaturated sulfide. Calculations are based on chromatogram peak integrations of both proton and sodium adducts of a specific chemical formula. The m/z value given in parentheses represents the thioacetal in-source decomposition observations. Method I refers to direct LC-MS analysis of the reaction medium; Method II corresponds to the direct freeze-drying (FD) of the reaction medium before analysis; Method III corresponds to an increase in pH with acetate buffer pH 4 followed by FD. With both models, the hemithioacetal intermediate is stabilized by FD into the corresponding thioacetal. LC-MS/MS experiments rule out the possible formation (post-FD) of both oxathiolane and α,β -unsaturated sulfide (B and D forms in Figure 4.6, respectively).....	79
Table 4.2 : Efficiency of conjugation of the M-Unit CS HCl salt to 5 equivalents of thiol-bearing molecules (3-mercaptopropionic acid and β -mercaptoethanol, MPA and BME respectively) per CS end unit for 72 h at pH 1. Reaction media were treated according to the following workups: Workup I (dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD); Workup II (FD + dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD); Workup III (increase in pH with acetate buffer pH 4 + FD + dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD). F below corresponds to the functionalization degree, considering 2 thiol molecules per potential aldehyde and calculated using Eqn (2) for BME and Eqn (3) for MPA with $N \geq 3 (\pm \text{SD})$. F was also calculated using Eqn (5), considering only the relative proportion of the remaining <i>gem</i> -diol per M-Unit. (* corresponds to the results of the conjugations implemented with 20 equivalents (instead of 5) of thiol-bearing molecule per end unit)	82
Table 4.3 : DLS measurements of unmodified CS and CS-b-PEG ₂ polyplexes prepared with pDNA (pEGFP _{Luc} , N/P = 3.7). Samples were analyzed in duplicate ($N=2, \pm(\text{max-min})/2$). The size of CS-b-PEG ₂ polyplexes is smaller as compared to native polyplexes.....	88

Table 5.1 : Sodium adducts of the 2,5-anhydro-D-mannose / Triskelion derivatization products observed in LC-MS.....	111
--	-----

LISTE DES FIGURES

- Figure 2.1 : Exemples de polymères cationiques utilisés pour la livraison d'ADN médicament ; a) Poly(L-Lysine) (PLL), b) Poly(éthylèneimine) branché (bPEI), c) poly(2-diméthylaminoéthyl methacrylate (PDMAEMA), d) Cyclodextrine avec son espaceur cationique diméthylsuberimide, e) Chitosane (CS). 8
- Figure 2.2 : Représentation chimique du Chitosane, mettant en scène ses deux unités caractéristiques (2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose et 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose reliées par une liaison glycosidique de type $\beta(1\rightarrow4)$). 11
- Figure 2.3 : Réaction de dépolymérisation du Chitosane par l'acide nitreux (HONO). La liaison glycosidique y est coupée par l'acide nitreux, libérant ainsi 2 chaînes plus courtes, dont l'une porte une extrémité réductrice 2,5-anhydro-D-mannose (GlcN = Glucosamine; GlcNAc = N-acétylglucosamine; Ac = Acétyle). 13
- Figure 2.4 : Analyse RMN ^1H d'un chitosane à 92% de DDA, le pic HOD n'apparaît pas car il a été présaturé (= irradié) pour obtenir une meilleure définition des pics. Le chitosane a été préalablement dissout dans un mélange $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (20 :1), avant d'être analysé à 70°C afin de décaler le pic H1D de celui du HOD. 64 scans ont été effectués avec un temps de relaxation fixé à 6s et un temps d'acquisition de 2s, temps nécessaire à la relaxation complète des spins des protons étudiés. 14
- Figure 2.5 : Représentation schématique des principaux protons du chitosane situés sur les unités acétylées (A unit) et désacétylées (D unit). Le mannose terminal formé suite à la réaction de dépolymérisation à l'acide nitreux porte le nom de M-Unit. 15
- Figure 2.6 : Représentation schématique de la formation de polyplexes par complexation entre un polymère cationique (CS) et un ADN plasmidique (pDNA) via interactions électrostatiques. Figure inspirée de Kohman *et al.* (Kohman, 2009). 17
- Figure 2.7 : Représentation schématique des contraintes rencontrées lors de la livraison d'acides nucléiques *in vivo* : Au niveau du plasma sanguin (Opsonines, enzymes de dégradation, concentration en sels), de la traversée des tissus biologiques et de la membrane cellulaire, de la sortie de l'endosome, du trafic intracellulaire, de la dissociation des complexes et pour les

pDNAs seulement, l'entrée du matériel génétique dans le noyau. Figure issue de Al Dosari <i>et al.</i> (Al-Dosari & Gao, 2009).	21
Figure 2.8 : Représentation schématique des différentes voies d'internalisation cellulaires des nanoparticules (NPs). Les chemins d'entrée varient principalement en fonction de la taille des particules, de leur charge de surface ainsi que du type de cellule transfectée (CNT= carbon nanotube; MSN= mesoporous silica nanoparticle; SPION= superparamagnetic iron oxide nanoparticle). Figure tirée de Kunzmann <i>et al.</i> (Kunzmann <i>et al.</i> , 2011).	25
Figure 2.9 : Représentation schématique du principe d'éponge à protons. L'on y voit l'entrée des ions H^+ et Cl^- , provoquant une rupture osmolytique de la membrane de l'endosome. Figure tirée de Nguyen <i>et al.</i> (Nguyen, J. & Szoka, 2012).	26
Figure 2.10 : Schématisation des mécanismes de résistances du PEG face aux phénomènes d'adhésion protéiques. A) Effet de stabilité stérique expliqué par une diminution de l'entropie ; B) Mobilité de la chaîne de PEG en fonction de sa taille. Figure inspirée de Lee et al. (Lee, J. H. <i>et al.</i> , 1995).	32
Figure 2.11 : Représentation schématique illustrant l'influence de la densité de PEG sur l'adsorption de protéines plasmatiques sur la surface de nanoparticules d'or et sur la séquestration de ces mêmes particules par les macrophages. Figure tirée de Walkey <i>et al.</i> (Walkey & Chan, 2012).	33
Figure 2.12. Configurations du PEG en fonction de sa densité sur une surface. (a) Le régime « champignon » où le PEG est considéré comme une demi-sphère de rayon R_f (Rayon de Flory) posée sur la surface. (b) Le régime « brosse » où le PEG est considéré comme un cône de longueur d'extension L . Figure adaptée de Harris et al. (Harris, J. M. & Chess, 2003)...	35
Figure 2.13 : Représentation schématique des 2 stratégies de PEGylation recensées dans la littérature ; La stratégie 1 représente la PEGylation des polyplexes chitosane-acide nucléique (CS-AN) après leur formation, alors que la stratégie 2 fait intervenir des copolymères en greffon (CS-g-PEG) ou en bloc (CS-b-PEG) lors de la formation de polyplexes PEGylés avec l'acide nucléique (AN).	37

- Figure 2.14. Représentation schématique des sites possibles de greffage de PEG sur la chaîne latérale du CS, formant des copolymères à greffon, CS-g-PEG. Notons que la position C6 des unités acétylées peut être également occupée par le PEG. 38
- Figure 2.15 : Mécanisme proposé de dépolymérisation du chitosane par l'acide nitreux (HONO) menant à la coupure de la chaîne de chitosane initiale et à la formation d'une unité terminale 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) sur l'un des deux brins formés (GlcN = glucosamine ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Ac = acétyle). 41
- Figure 2.16 : Représentation schématique de la formation d'une base de Schiff par condensation de l'aldéhyde porté par le mannose terminal d'un brin de chitosane (CS) et d'une fonction amine déprotonnée d'un second brin de CS (GlcN = glucosamine ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Ac = acétyle). 42
- Figure 2.17 : Représentation schématique de l'équilibre de mutarotation du glucosamine entre ses anomères α et β , passant par la forme ouverte qui présente une fonction aldéhyde. Par souci de clarté, uniquement la forme pyranose du glucosamine est représentée. 44
- Figure 2.18 : Représentation schématique de la structure attendue de "Block Ionomer Complex" via la complexation entre bloc copolymère CS-b-PEG et acides nucléiques sous un aspect micellaire (Coeur hydrophobe couronné de PEG, appelé ici IPEC pour « Interpolyelectrolyte complex »). Figure adaptée de Pergushov *et al.* 2012 (Pergushov *et al.*, 2012). 47
- Figure 3.1 : Représentation schématique du développement du procédé de thioacétylation en bout de chaîne du CS (Pickenhahn *et al.*, 2015). Le premier objectif de cette étude est de déterminer la disponibilité de la forme réactive de l'aldéhyde terminal du CS, porté par le 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) (1), ce dernier étant en équilibre avec sa forme hydratée et non-réactive (2). Bien que dans l'eau, cet équilibre semblerait être déplacé vers la forme hydratée de l'aldéhyde, dite *gem*-diol, une chimie de conjugaison efficace sur cet aldéhyde serait toutefois possible par catalyse acide en conditions aqueuses. Le second objectif de ce projet est l'étude de la réactivité de l'aldéhyde terminal du CS envers les thiols. Le mécanisme proposé ferait intervenir une première attaque de thiol (ex : β -mercaptoethanol et acide 3-mercaptopropionique, BME and MPA respectivement) sur l'aldéhyde de la M-Unit formant l'intermédiaire hémithioacétal (3) au travers d'un équilibre pH-dépendent. Par analogie avec

la formation d'imines dans laquelle l'équilibre est déplacé lorsqu'on retire l'eau, l'hémithioacétal serait lui stabilisé en thioacétal par lyophilisation (4). 51

Figure 3.2 : Représentation schématique du développement de l'activation régiosélective de l'extrémité terminale du CS par thioacétylation par un linker trivalent (1) nommé Triskelion (Pickenhahn *et al.*, 2016). Ce dernier comprend un crochet-thiol (encadré) et une extrémité thiol située au bout d'un espaceur. La dérivation de l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit par le Triskelion devrait principalement former le thioacétal (2) en promouvant l'attaque du crochet-thiol via un mécanisme de thioacétylation intramoléculaire. Ce procédé serait plus efficace que la stratégie intermoléculaire évoquée dans le Chapitre 4, les deux attaques successives de thiols nécessaires à la stabilisation en thioacétal se faisant alors simultanément. Une fois le CS activé par le Triskelion (formation du CS-b-Triskelion), son extrémité thiol restante serait capable de réagir librement par déplacement de pont disulfure ou encore par addition de Michael (3). 53

Figure 4.1 : Production of 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) at the reducing end of chitosan by depolymerization in nitrous acid (HONO): chitosan depolymerization with nitrous acid (HONO) is a rapid, well-understood, and easily controlled method for producing chitosan harbouring a 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) at the reducing end of the cleaved polymer (Allan & Peyron, 1995a). A free aldehyde group (electrophile) is then potentially accessible (1) for reaction with nucleophilic moieties (e.g., CS amine groups, thiols, oxyamines, etc.). Tømmeraas *et al.* (Tømmeraas, K *et al.*, 2001) demonstrated that the M-Unit aldehyde also exists in its *gem*-diol hydrated form (2). The neutralization of CS and subsequent freeze-drying of the depolymerization medium induces a Schiff base formation between CS neutralized amines that react with the CS M-Unit aldehyde (3). The rehydration of the imino-adducts in acidic aqueous conditions cleaves the imino linkage between CS chains, transforming the M-Unit into hydroxymethylfurfural (HMF) (4). 58

Figure 4.2 : Schematic representation of the equilibria involved in thiol-carbonyl additions. 59

Figure 4.3 : Thioacetal conjugation to the chitosan M-Unit formed post-HONO depolymerization: the first objective of this study was to assess the availability of the reactive form of the unhydrated M-Unit aldehyde (2). Although there could be a strong displacement of the equilibrium towards the unreactive aldehyde-hydrated or *gem*-diol form in water, we

hypothesized that efficient nucleophilic conjugation to the M-Unit was possible in acidic aqueous conditions. The second objective was to assess the M-Unit reactivity towards thiol moieties in aqueous conditions. The proposed reaction pathways between CS end-groups and thiols include the M-Unit CS aldehyde reacting directly with a thiol-bearing model molecule (β -mercaptoethanol and 3-mercaptopropionic acid, BME and MPA respectively) to form a hemithioacetal intermediate (3) through a pH-dependent equilibrium. By analogy with Schiff base formation where the equilibrium displacement occurs by water removal, the hemithioacetal can be stabilized into the corresponding thioacetal (4) by freeze-drying..... 61

Figure 4.4 : Experimental Design Flowchart. A) Mechanistic studies. Glucosamine (GlcNH_2) was treated with nitrous acid to form the 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) that was reacted with 2 thiol-bearing molecules (β -mercaptoethanol and 3-mercaptopropionic acid, BME and MPA, respectively). The reaction products were treated using one of 3 methods, i.e. Method I: Direct LC-MS analyses to determine to which extent thioacetal formation occurs in situ; Method II: Freeze-drying (FD) + LC-MS analyses to assess the effect of FD on the thioacetal proportion and to ascertain that no by-products appear post FD; Method III: Acetate buffer pH 4 + FD + LC-MS analyses to determine the effect of an increase in pH prior to FD (this pH increase was included here to prevent any CS acid hydrolysis that could occur when Method II, i.e. FD at pH 1, would be transposed to the polymer). B) Chitosan M-Unit reactivity. CS 92-200 was depolymerized with nitrous acid to produce CS 92-2 HCl salt bearing the M-Unit at the cleaved end of the polymer. M-Unit CS 92-2 HCl salt were reacted with MPA and BME and the reaction products treated with one of 3 workups: Workup I: Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to remove all thiol model excess and to determine the in situ thioacetal formation rate; Workup II: FD + Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to determine the effect of FD on the functionalization rate; Workup III: Acetate buffer pH 4 + FD + Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to determine the effect of an increase in pH prior to FD on the functionalization rate (this pH increase was included to prevent any CS acid hydrolysis that could occur during FD at pH 1 in Workup II). The degree of functionalization of the CS conjugates was determined by ^1H NMR, whereas covalent conjugation was assessed by DOSY NMR experiments and Ellman assays in order to rule out the possibility of a simple physical mixture of reagents. 63

- Figure 4.5 : Structure of BME (top) and MPA (bottom) chitosan adducts. The protons corresponding to the ^1H NMR peaks used for the calculations of the functionalization degree in Eqn (2) and Eqn (3) are highlighted. 71
- Figure 4.6 : Schematic representation of potential reactions occurring during conjugation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) and 2 thiol-bearing models (3-mercaptopropionic acid and β -mercaptoethanol, MPA and BME respectively) giving the following expected products: product A is the hemithioacetal intermediate that is in equilibrium with its corresponding oxonium, whereas products B and C correspond to the oxathiolane (for BME reactions only) and thioacetal, respectively. Molecule D represents the α,β -unsaturated sulfide. The results of this study suggest that the thioacetal C corresponds to the only stable form observed after freeze-drying. 77
- Figure 4.7 : Thiol addition to the aldehyde group of the M-Unit CS HCl salt under acidic aqueous conditions: despite the fact that the aldehyde is only present in trace amounts within the reaction medium, the pH- dependent hemithioacetal intermediate formation equilibrium can be displaced by the intermediate stabilization into the corresponding thioacetal at low thiol concentration. 83
- Figure 4.8 : ^1H NMR spectrum of the CS-b-PEG₂ block-copolymer after workup II (D_2O , $T = 70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6 s, acquisition time = 2 s, exponential apodization = 1 Hz). Integration of *gem*-diol proton peak was used to calculate the functionalization degree (in this particular case, $F = 51\%$ according to Eqn (5)). 86
- Figure 4.9 : Environmental scanning electron microscopy (ESEM) pictures (high vacuum mode, accelerating voltage = 20.0 kV; spot size = 3 and working distance = 5 mm) of polyplexes formed with pDNA and unmodified CS or CS-b-PEG₂ block-copolymer (amine to phosphate ratio = 3.7, N/P = 3.7). (A and B) (x80 000 and x160 000, respectively): polyplexes formed with CS 92-10 are heterogeneous in size and present various morphologies (globular, rod-like and toroidal). Pictures C and D (x80 000 and x160 000, respectively): polyplexes formed with CS-b-PEG₂ (CS 92-10 and mPEG-SH 2 kDa), are uniformly spherical. 87
- Figure 4.10 : Summary of mechanisms elucidated in this study for thiol-based end-group derivatization of chitosans: CS nitrous acid depolymerization induces the formation of M-

Unit that carries an aldehyde moiety at the end of the cleaved polymer (1). The equilibrium between the M-Unit aldehyde and its hydrated form (*gem*-diol) is strongly displaced towards the latter (2). If the CS depolymerization medium is freeze-dried at pH well below the CS pKa (i.e. pH ~3-4 or below), all the CS amines are protonated and are therefore unable to react with any aldehyde group, maintaining the CS M-Unit integrity at the end of the cleaved polymer (3). Nevertheless, the equilibrium between the M-Unit aldehyde and the corresponding *gem*-diol is still displaced towards the hydrated form (4). Despite the undetectable aldehyde moieties, thiol molecules and the M-Unit CS aldehyde are engaged in a pH-dependent equilibrium with the corresponding hemithioacetal intermediate (5). The stabilization of the latter into its thioacetal form (6) occurs either by increasing the amount of thiol-bearing reactants in the medium (*in situ* stabilization), or by freeze-drying the reaction medium when low amounts of thiol are engaged. 89

Figure 5.1 : Schematic representation of the CS end-group thioacetylation processes developed by our group: A) Summary of the previously described chitosan end-group thioacetylation process (Pickenhahn *et al.*, 2015). Briefly, CS nitrous acid (HONO) depolymerization induces the formation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) that carries an aldehyde moiety at the end of the cleaved polymer. Despite the fact that this aldehyde is present almost completely in its hydrated and non-reactive form (*gem*-diol), thiolated macromolecules react with it in strong acidic conditions (pH 1) through a pH dependent equilibrium, forming the corresponding hemithioacetal intermediate (structure 1). The stabilization of the latter into its thioacetal form (structure 2) occurs with a second thiolated macromolecule attack on the same location, an attack that may be sterically hindered by the presence of the first macromolecule. B) The novel HONO-depolymerized CS end-group thioacetylation process. The trivalent linker (structure 3), referred to as Triskelion, comprises a thiol-hook (framed) and a thiol-tail. The derivatization of CS end-groups with Triskelion should predominantly lead to the formation of structure 4 by promoting the thiol-hook attack on the CS aldehyde through a facilitated and more efficient intramolecular thioacetylation process *vs.* the previously described intermolecular strategy (Pickenhahn *et al.*, 2015). The terminally-activated CS (i.e. the CS-b-Triskelion adduct) can freely react with any thiol-reactive species or structure through its remaining thiol-tail, as represented in structure 5. 97

Figure 5.2 : Schematic representation of the Triskelion synthesis pathway. The triol starting material, namely 1,2,6-hexanetriol (**1**), was activated with methanesulfonyl chloride (MsCl) (**2**) in an anhydrous 2:1 mixture of dichloromethane (DCM) and tetrahydrofuran (THF) (**a**). Mesylate leaving groups (-OMs) were displaced by potassium thioacetate (AcSK) in anhydrous dimethylformamide (DMF) (**b**) to give the acetyl-protected Triskelion linker (**3**) as major product. The cleavage of acetyl groups was performed using sodium methoxide (MeONa) (**c**) in order to obtain the desired Triskelion linker (**4**) in high yields (66% over 3 steps). Compounds (**5**) and (**6**) correspond to the elimination products obtained after mesylate group displacement. The detailed synthesis protocols are available in Supp. Info.; Annexe C – Section 1. Summary of conditions: (**a**) MsCl in anhydrous [2:1] DCM/THF at room temperature for 3h; (**b**) AcSK in anhydrous DMF at 0-5°C overnight; (**c**) MeONa in MeOH at room temperature for 5-10 min. 100

Figure 5.3 : Experimental design flowchart. (A) Mechanistic studies. M-Unit (2,5-anhydro-D-mannose) obtained by HONO treatment of glucosamine, was reacted with molecules bearing a thiol-hook (Ethanedithiol -EDT- and Triskelion linker). The products of these reactions were treated using either Method I: Direct LC-MS of the reaction mixture to determine to which extent intramolecular thioacetal formation occurs in situ or Method II: Concentration prior to perform LC-MS analysis to determine the influence of such dehydration/concentration step on the final products proportion and also to detect some by-products formation upon concentration). (B) M-Unit CS HCl salt reactivity. M-Unit CS HCl salt was also reacted with Ethanedithiol -EDT- and Triskelion linkers. After reaction completion, reaction media were treated using either: Workup I: Unreacted thiol-hook molecules removal by reprecipitation + NaOH treatment + reprecipitation in order to determine the in situ conjugation process efficiency or Workup II: Concentration by FD or rota-evaporation + Workup I in order to quantify a potential increase in conjugation efficiency upon concentration. Conjugation process efficiencies were determined by ^1H NMR using both Equations 1 & 2 as detailed in the section below..... 101

Figure 5.4 : Structure of unmodified CS (top) and CS-b-Triskelion adduct (bottom). The protons corresponding to the ^1H NMR peaks used for the calculations of the functionalization degree in Equations 1 and 2 are shown in green, blue and red..... 105

Figure 5.5 : Schematic representation of thiol-activated magnetic beads surface modification. CS-b-Triskelion was attached to thiol-activated magnetic microparticles through pyridyl disulfide bond displacement with the release of the pyridinethione leaving group..... 106

Figure 5.6 : Stacked ^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3 , ns = 32 scans, acquisition time = 2s, d1 = 2s) of the trivalent Triskelion linker 3-step synthesis. Step 1 (conversion of Tri-OH into Tri-OMs) was obtained with 93% yield, Step 2 (conversion of Tri-OMs into Tri-SAc) led to the desired tri-thioacetate with 75% yield and Step 3 (conversion of Tri-SAc into Tri-SH) gave the deprotected Triskelion linker with 95% yield. The products of the synthesis were also characterized by ^{13}C NMR spectroscopy and Mass spectrometry (Supp. Info; Annexe C – Section 1). 109

Figure 5.7 : Schematic representation of potential Triskelion-derivatized 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) products. Since the Triskelion linker carries three reactive thiol moieties able to engage into the thioacetylation process (“thiol-hook” vs. “thiol-tail”), there are three potential observable structures: Structure A which corresponds to the expected intramolecular thioacetal obtained from thiol-hook reaction with the M-Unit aldehyde; Structure B represents the hemithioacetal intermediate that is formed upon reaction of the thiol-tail with the M-Unit aldehyde. This structure is unstable and it can be stabilized by a second Triskelion attack to form the structure C, the intermolecular thioacetal. All the potential disulfide related products such as A-ss-A, B and C with a disulfide closed hook were considered within the calculations without being represented in this figure. The LC-MS results indicate that the intramolecular thioacetal (structure A) corresponds to the major derivatization product observed by LC-MS when MeOH is used as co-solvent, whereas the intermolecular thioacetal (structure C) is favored when THF is used as co-solvent. 110

Figure 5.8 : Relative proportion of the M-Unit / Triskelion conjugation products observed by LC-MS (See Figure 5.7 and Tableau 5.1). Products A, B and C represent the intramolecular thioacetal, the hemithioacetal intermediate and the intermolecular or linear thioacetal, respectively. Each conjugation reaction (10-20 mM aldehyde, pH 1, $T = 50^\circ\text{C}$, $t = 72\text{h}$, 30% THF or 90% MeOH) was performed in triplicates ($N = 3$) and the reaction media were treated as follows: Method I refers to a direct LC-MS analysis of the reaction medium whereas Method II stands for a concentration to dryness step prior to performing LC-MS. All the

potential disulfide related products such as A-ss-A, B and C with a disulfide closed hook were considered within the calculations (Tableau 5.1). The results of this semi-quantitative study suggest that the intramolecular thioacetylation (A) is the favored mechanism of M-Unit / Triskelion conjugation when MeOH is used as co-solvent. On the other hand, the intermolecular thioacetal (C) is predominantly formed when THF is used as co-solvent, possibly because of some thiol-hook deactivation occurring due to the presence of peroxides within THF. 112

Figure 5.9 : Conjugation efficiency of the M-Unit CS HCl salt reacted with 20 equivalents of molecules bearing a thiol-hook (EDT and the Triskelion linker) per CS end-group for 24-72h at pH 1 and 50°C. 30% isopropanol (iPrOH) and 90% methanol (MeOH) were used as co-solvent for EDT and Triskelion linker solubilization, respectively. The nomenclature used in the graphical representation herein is: “Solvent pH-duration” (i.e., iPrOH 1-72 stands for 30% isopropanol at pH 1 for 72h). Reaction media were treated according to Workup I (alkali treatment + precipitation in THF) and Workup II (concentration to dryness + alkali treatment + precipitation in THF). Functionalization degrees (F) were calculated using Equation 2 (decrease in Gem-diol peak intensity) and confirmed with Equation 1 considering 1 molecule bearing a thiol-hook per purified CS adduct. Functionalization degrees calculated with Equation 1 are not shown here since they were with 2% of those obtained with Equation 2. (* corresponds to the results of the conjugations obtained with 5 equivalents of thiol-hook per M-Unit aldehyde instead of 20). 113

Figure 5.10 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, $n_s=64$ scans, acquisition time=2s, $d_1=10\text{s}$. The sample herein corresponds to the CS-b-Triskelion conjugate obtained after 72h reaction in 90% MeOH (MeOH 1-72) and processed as per Workup II. Functionalization degrees F of 91% and 92% were obtained using Equations 1 and 2, respectively. 115

Figure 5.11 : Proposed mechanism of the Triskelion linker conjugation to M-Unit CS under acidic aqueous conditions. Although the rate limiting step of this conjugation process is the transformation of the gem-diol into its corresponding active aldehyde, the latter is engaged in an equilibrium with the hemithioacetal intermediate (in brackets) upon thiol-hook addition (Triskelion linker shown herein). As suggested by LCMS studies, the hemithioacetal intermediate is readily transformed into its stable thioacetal counterpart with the release of a

water molecule. The equilibrium between the M-Unit aldehyde and the hemithioacetal can be displaced towards the latter by increasing both the amount of thiol-hook engaged in the reaction and the reaction duration..... 116

Figure 5.12 : DOSY spectrum of the CS-b-Triskelion conjugate (MeOH 1-72, Workup II). 16 gradients between 2.5 and 50.0 gauss.cm⁻¹ with a gradient pulse (δ) of 3 ms, a diffusion time (Δ) of 150 ms. Both CS and Triskelion have the same translational diffusion coefficient at 25°C in D₂O, indicating that they are joined together by a covalent bond..... 116

Figure 5.13 : ¹H NMR spectra (400 MHz, D₂O, T=25°C, ns=256 scans, acquisition time=2s, d1=10s) representing A) the initial CS + CS-b-Triskelion mixture that was engaged with the thiol-activated magnetic beads and B) the released CS-b-Triskelion post treatment. Both spectra were normalized using the unmodified CS acetyl peak (δ = 2.06 ppm, 5.59 H) for comparison purpose. Both equations 1&2 were used to calculate functionalization degree of CS mixture and released CS calculations, giving 70% (\pm 2) and 95% (\pm 2), respectively. This result indicates that only CS-b-Triskelion adducts bind to the thiol-activated beads through disulfide linkage displacement..... 119

Figure 6.1 : Représentation schématique de l'addition de thiol sur l'aldéhyde terminal du CS porté par la M-Unit en conditions aqueuses. Ainsi, en dépit du fait que l'aldéhyde soit principalement présent sous sa forme hydratée et non-réactive, l'équilibre de formation de l'intermédiaire hémithioacétal peut être déplacé par stabilisation de ce dernier lors d'une seconde attaque de thiol, formant le thioacetal correspondant. 124

Figure 6.2 : Résumé graphique du premier article dédié à ce projet de Doctorat (Pickenhahn *et al.*, 2015). A) Représentation schématique de la PEGylation en bout de chaîne du CS par thioacétylation: Bien que l'aldéhyde porté par la M-Unit soit majoritairement présent sous sa forme hydratée et non-réactive, une première attaque de PEG-thiol (PEG-SH) sur l'aldéhyde de la M-Unit forme un intermédiaire hémithioacétal instable. Une seconde attaque de PEG-thiol est alors nécessaire afin de stabiliser cette structure, formant le bloc-copolymère CS-b-PEG₂ correspondant par thioacétylation. B) Formation de BICs : Les copolymères CS-b-PEG₂ ont ensuite été engagés avec de l'ADN plasmidique pour former des structures polyélectrolytes ayant un caractère micellaire, les BICs. 126

Figure 6.3 : Représentation schématique de l'activation de l'extrémité du CS par thioacétylation régiosélective. Dans une première étape, l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit a été engagé avec un linker trivalent, le Triskelion, *via* un mécanisme de thioacétylation intramoléculaire. Les conjugués obtenus pourront alors être utilisés pour attacher l'extrémité du CS sur des surfaces, des polymères et des ligands portant des fonctions réactives aux thiols et ce en utilisant des chimies moins agressives..... 129

Figure 7.1 : Modifications du Triskelion proposées afin d'améliorer le procédé d'activation terminale du CS. La protection sélective de l'extrémité thiol du Triskelion (**1**), celle qui n'est pas destinée à être engagée avec le CS, permettrait de favoriser l'attaque du crochet-thiol sur l'aldéhyde du mannose terminal. Une fois le CS activé par le Triskelion, cette extrémité serait déprotégée pour permettre d'autres conjugaisons. La flexibilité de l'espaceur étant primordiale quant au succès des futures réactions, le fait d'augmenter sa longueur (**2**) permettrait d'en accroître l'efficacité. Enfin, le fait de conjuguer régiosélectivement un PEG de petite taille au bout du Triskelion permettrait de d'effectuer l'activation du CS en conditions aqueuses uniquement..... 133

Figure 7.2 : Représentation schématique de la fonctionnalisation couche par couche de particules cationiques préformées. Des particules chargées positivement (**1**) seraient recouvertes *via* interactions électrostatiques par de l'AN (siRNA et/ou mRNA et/ou pDNA, etc.) (**2**). Les particules ainsi obtenues pourront alors être protégées dans la circulation sanguine par l'ajout d'une couche de copolymère sur leur surface, toujours par interactions électrostatiques (**3**). 134

Figure 7.3 : ^1H NMR spectrum of the CS 92-1 depolymerization medium ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (50 mM), $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 2000, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). No aldehyde proton peak was observed around 8-10 ppm, the hydrated *gem*-diol form remaining predominant. 157

Figure 7.4 : ^1H NMR spectrum of the CS-BME product after workup II ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$, $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). Integration of BME ($-\text{CH}_2\text{-S}-$) protons peaks was used to calculate the functionalization degree ($F=70\%$ in this particular case, according to Eqn (2))..... 158

- Figure 7.5 : ^1H NMR spectrum of the CS-MPA product after workup II ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$, $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). Integration of MPA protons peaks was used to calculate the functionalization degree ($F=52\%$ in this particular case, according to Eqn (3)). 159
- Figure 7.6 : ^{13}C solid state NMR (CP-MAS) of an extra-dried CS 99-1 salt. The sample preparation as well as the analysis was performed under inert atmosphere (N_2) to avoid contact with water content in air. ($T=25^\circ\text{C}$, $t=6\text{h}$, $\nu=12\text{kHz}$). 160
- Figure 7.7 : DOSY spectrum of the CS HCl salt M-Unit conjugated to MPA. 32 gradients between 11.2 and $358.4\text{ gauss.cm}^{-1}$ with a gradient pulse (δ) of 1 ms, a diffusion time (Δ) of 60 ms. Both CS and MPA have the same translational diffusion coefficient at 25°C in 2% DCl in D_2O 161
- Figure 7.8 : ^1H NMR, 400 MHz, CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s. ... 163
- Figure 7.9 : ^1H NMR, 400 MHz, CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s. ... 165
- Figure 7.10 : ^1H NMR, 400 MHz, CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s. . 167
- Figure 7.11 : Stacked ^1H NMR spectra representing the Triskelion linker decomposition which occurs upon longer sodium methoxide deprotection duration ($t = 10\text{ min}$ vs. $t = 20\text{ min}$).. 167
- Figure 7.12 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=6s..... 169
- Figure 7.13 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=70^\circ\text{C}$, ns=64 scans, acquisition time=2s, d1=10s. Functionalization degree were calculated with Equations 1 and 2, giving $F = 67\%$ 174
- Figure 7.14 : Schematic representation of the Thiol-activated surface modification with CS-b-Triskelion 3-steps procedure. Step 1 refers to Thiol-activated Magbeads preparation, whereas Steps 2 and 3 refer to CS-b-Triskelion reduction and its conjugation onto beads surface, respectively. 177

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

$[M+H]^+$	Proton adduct (MS)
$[M+Na]^+$	Sodium adduct (MS)
°C	Degré Celsius
1H NMR	Résonance magnétique nucléaire du proton
A Unit	Unité acétylée du chitosane
A_2	Second virial coefficient
Ac	Acétyle
AN	Acide nucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amine II	Amine secondaire
ARN	Acide ribonucléique
AUC	Ultracentrifugation analytique
BAM	N-tert-butylacrylamide
BIC	Bloc ionomer complex
BME	Beta-Mercaptoethanol
CMC	Concentration micellaire critique
CNTs	Carbon nanotubes
COSY	correlation spectroscopy (NMR)
CP-MAS	Cross Polarization - Magic Angle Spinning (NMR)
CS-AN	Polyplexe de chitosane - acide nucléique
CS-b-PEG	Copolymère en bloc CS-PEG
CS-b-PEG ₂	Copolymère en bloc CS-PEG portant 2 PEGs par CS
CS-b-PEI	Copolymère en bloc CS-PEI

CS-g-(PEI-b-PEG)	Copolymère en bloc PEI-PEG greffé latéralement sur le CS
CS-g-PEG	Copolymère à greffon CS-PEG
CS-pDNA	Polyplexe de chitosane-ADN plasmidique
D Unit	Unité désacétylée du chitosane
DCM	Dichloromethane
DDA	Degré de désacétylation
ddH ₂ O	Double deionized H ₂ O
DLS	Diffusion de lumière dynamique
DLVO	Théorie de Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNAses	Enzymes de dégradation d'ADN
DOSY	Diffusion ordered spectroscopy
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
E2	Élimination d'ordre 2
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDT	Ethanedithiol
ESEM	Environmental Scanning Electron Microscope
F	Functionalization degree
FD	Freeze-dry / Freeze-drying
FDA	Food and Drug Administration (USA)
GlcN	D-glucosamine
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GlcNH ₂	D-glucosamine

H1D	Proton H1 de l'unité désacétylée du chitosane
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy (NMR)
HMF	Hydroxymethylfurfural
HONO	Acide nitreux / Nitrous acid
IgG	Immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IPEC	Interpolyelectrolyte complex
iPrOH	2-propanol / isopropanol
IR	Infrarouge
kDa	KiloDalton
L	Longueur d'extension du PEG en mode brosse
LC-MS	Liquid chromatography - Mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
LC-TOF	Liquid chromatography - time-of-flight (MS)
M-Unit	2,5-anhydro-D-mannose
MAL	Maléimide
MALS	Diffusion de lumière statique
MeOH	Methanol
MeONa	Sodium methoxide
MHz	MegaHertz
mm	Millimètre
M _n	Masse molaire moyenne en nombre
MPA	Mercaptopropionic acid
mPEG-SH	Methoxy PEG thiol

mRNA	ARN messenger
ms	Millisecond
MsCl	Methanesulfonyl chloride
MSNs	Mesoporous silica nanoparticles
MTOC	Microtubules organizing center
M _w	Masse molaire moyenne en masse
MWCO	Molecular weight cut-off
N-2-graft	Modification sur l'amine du CS
N:P int	Ratio amine/phosphate interne
N:P prep	Ratio amine/phosphate de préparation
NA	Nucleic acid
NHS	N-hydroxysuccinimide
NHS-PEG-MAL	α -malemidyl- ω -N-hydroxysuccinimidyl poly(éthylène glycol)
NIPAM	N-isopropylacrylamide
nm	nanomètre
NP(s)	Nanoparticule(s)
NSERC	Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada
NTA	Nanoparticle tracking analysis
O-6-graft	Modification sur l'hydroxyle en C6 du CS
ODN	Oligonucléotide antisens
OMs	Mesylate
pD	Potentiel deuterium
PDI	Indice de dispersité
PDMAEMA	Poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)

pDNA	ADN plasmidique
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEG-b-PLL	Copolymère en bloc PEG et Poly-L-lysine
PEG-NHS	N-hydroxysuccinimidyl poly(éthylène glycol)
PEI	Poly(éthylèneimine)
PEI-pDNA	Polyplexe de PEI-ADN plasmidique
pH	Potentiel hydrogène
pK _a	Constante d'acidité
PLL	Poly(L-lysine)
PIP	Plasmatique protéines
PLR	Poly-L-arginine
PPI	Protéines plasmatiques
ppm	Parts per million
RES	Système réticulo-endothélial
R _f	Rayon de Flory
r _g	Rayon de gyration
RH%	Relative humidity
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RNases	Enzymes de dégradation d'ARN
ROP	Ouverture de cycle
SAc	Thioacetate
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering
siRNA	ARN interférent

SN ₂	Substitution nucléophile d'ordre 2
SPIONs	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles
T	Température
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM	Microscope électronique à transmission
THF	Tetrahydrofurane
TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte
TLC	Thin layer chromatography
TLR	Toll-like receptor
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
UV	Ultraviolet
V _a	Potentiel attractif de van der Waals (DLVO)
vdW	van der Waals
VPEG	Potentiel répulsif du PEG (DLVO)
V _r	Potentiel répulsif électrostatique (DLVO)
w/w	Masse/masse
ΔG _M	Énergie libre de mélange
ΔH _M	Enthalpie de mélange
ΔS _M	Entropie de configuration de mélange
χ	Paramètre d'interaction « polymère-solvant »

LISTE DES ANNEXES

Annexe A- Liste non –exhaustive des différentes voies d’administration pour la livraison de gènes médicaments.	156
Annexe B – Article 1 : Informations supplémentaires.....	157
Annexe C - Article 2 : Informations supplémentaires	162

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le séquençage du génome humain a, depuis maintenant quelques décennies, ouvert la porte à de nouvelles stratégies thérapeutiques, telles que la thérapie génique, pour traiter des maladies considérées comme incurables. La thérapie génique est une approche de traitement potentielle pour un vaste éventail de pathologies, qu'elles soient héréditaires ou acquises. Il s'agit d'un procédé fondé sur l'introduction de matériel génétique chez un patient, afin d'insérer un allèle fonctionnel du ou des gènes déficients responsables de sa maladie, ou de modifier l'expression du ou des gènes délétères impliqués dans sa pathologie (Naldini, 2009). La livraison d'acide nucléique repose sur deux composantes principales : la première est que le matériel génétique doit pouvoir être exprimé à l'endroit voulu et la seconde est que le matériel génétique utilise un système de livraison efficace et sûr, jusqu'aux cellules cibles. Ce dernier point correspond au thème principal de ce projet de Doctorat, à savoir le développement d'un système de livraison d'acide nucléique de deuxième génération à base de chitosane.

1.1 Cadre de la recherche

Le contexte de cette thèse sera exposé dans le Chapitre 2 qui correspond à la revue de littérature inhérente à mon projet de Doctorat. Brièvement :

Les **acides nucléiques** (ANs), macromolécules biologiques portant l'information génétique, sont hydrophiles et portent une charge globale négative ce qui limite leur passage au travers des membranes biologiques. D'autre part, les ANs sont extrêmement sensibles et sont ainsi rapidement dégradés par les endonucléases contenues dans le plasma sanguin (Mintzer & Simanek, 2009). Le principal challenge de ces études est le design de transporteurs spécifiques qui permettront une transfection efficace. Ainsi pour placer le gène-médicament, on utilise des **vecteurs** capables de pénétrer les cellules et d'y libérer leur AN soit dans le cytoplasme, soit dans le noyau (dépendamment du type de matériel génétique à introduire).

On dénombre deux catégories distinctes de vecteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Les vecteurs viraux sont des virus dont on a inhibé le potentiel infectieux, comme les rétrovirus ou les adénovirus. Ces derniers ont un taux de transfection élevé mais présentent une forte immunogénicité (Verma & Somia, 1997). Les **vecteurs non viraux** tels que les phospholipides et autres polycations sont à l'inverse faiblement immunogènes, moins onéreux mais ont des taux de

transfection moins élevés (Al-Dosari & Gao, 2009). Le rôle de tout type de vecteurs doit donc être de transporter les ANs dans la circulation sanguine, de passer efficacement les membranes biologiques (dont la membrane cellulaire) et de libérer leur matériel génétique à l'intérieur de la cellule.

Au sein de notre laboratoire (Biomaterials and Cartilage Laboratory, Polytechnique Montréal), le chitosane (CS) est utilisé en tant que vecteur non-viral pour la livraison d'ANs. Ce polycation d'origine naturelle va se lier à l'AN *via* interactions électrostatiques formant ainsi des **polyplexes ou nanoparticules** (NPs) dotées de charges résiduelles positives, notées polyplexes CS-AN. Lors de leur administration par voie parentérale (*in vivo*), les NPs sont confrontées à des conditions salines importantes et au pH physiologique, conditions qui masquent leurs charges répulsives et provoquent leur **agglomération irréversible**, facilitant ainsi leur reconnaissance et leur élimination par le complexe réticulo-endothélial (Mayer *et al.*, 1989). D'autre part les protéines plasmatiques présentes dans le plasma sanguin (telles les opsonines), vont rapidement se lier à de telles particules permettant également aux macrophages de les reconnaître puis de les éliminer rapidement sans qu'elles puissent jouer leur rôle thérapeutique (Owens & Peppas, 2006).

Un moyen de remédier à ces limitations et donc de prolonger la demi-vie des polyplexes *in vivo*, consiste à l'addition de **poly(éthylène glycol)** (PEG) au sein des formulations de NPs; procédé appelé PEGylation. En effet, ce polymère hautement hydrophile va créer un bouclier hydratant qui empêchera l'agrégation des particules et permettra par la même occasion de limiter les attaques des opsonines et autres enzymes de dégradation (Lee, J. H. *et al.*, 1995).

On différenciera deux grandes stratégies de PEGylation pour les polyplexes CS-AN : le greffage de PEG en surface de la NP préformée et la formation de polyplexes à l'aide de **copolymères CS-PEG** (Casettari *et al.*, 2012). Au niveau de cette dernière option, on distingue 2 types de copolymères CS-PEG : le copolymère à greffons, noté CS-g-PEG, où le PEG est greffé sur la chaîne latérale du CS et le **copolymère à blocs**, noté CS-*b*-PEG, où le PEG est régiosélectivement attaché en bout de chaîne du CS.

La position latérale du PEG sur le CS présente deux inconvénients majeurs : D'une part le PEG serait susceptible de masquer les charges positives portées par les amines du CS et donc d'empêcher sa complexation aux charges négatives de l'AN ; et d'autre part le PEG pouvant se greffer à différentes positions sur la chaîne de CS, un problème d'uniformité pourrait porter

préjudice à une bonne répétabilité des résultats. Ainsi, une fois conjugué en position terminale du CS, le PEG serait moins enclin à entraver la formation des polyplexes (Casettari *et al.*, 2012).

L'originalité de cette approche consiste à l'auto-assemblage de NPs via des copolymères à blocs CS-*b*-PEG et d'ANs. De tels polyplexes, appelés « **Bloc ionomer complex** », adoptent une structure micellaire dans laquelle l'acide nucléique serait complexé au chitosane par liaison électrostatique, le tout étant enrobé d'une pellicule de PEG protectrice (Kabanov, V. A. & Kabanov, 1998).

1.2 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de Doctorat est donc la synthèse de copolymères à blocs, CS-*b*-PEG, en conjuguant le PEG sur l'extrémité terminale de la chaîne de CS. De telles structures seront alors engagées avec de l'acide nucléique (ADN plasmidique) afin de former des complexes interpolyelectrolytes ayant un comportement micellaire, les BICs.

1.3 Approche envisagée

Afin de parvenir à la synthèse chimique de copolymères CS-*b*-PEG, il est tout d'abord nécessaire de déterminer avec précision le point d'attache du PEG sur l'extrémité terminale du CS. Une fois ce point d'encrage caractérisé, il sera important de sélectionner et d'appliquer une chimie de conjugaison adéquate pour s'assurer de l'efficacité et de la régiosélectivité du procédé de PEGylation. Le copolymère alors obtenu, il sera utilisé pour former des polyplexes PEGylés avec de l'ADN plasmidique par auto-assemblage.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La thérapie génique

Par définition, la thérapie génique a pour but d'introduire chez un patient la copie normale du ou des gènes déficients responsables de sa maladie, ou bien de modifier l'expression du ou des gènes délétères impliqués dans une pathologie (Gilgenkrantz, 2007).

Depuis 1989 et le premier essai clinique de thérapie génique, leur total cumulé a dépassé les 2000 en 2016 (Kumar, S. R. P. *et al.*, 2016). Bien que dans les premiers temps, seulement de rares succès aient été rapportés, de plus en plus d'études effectuées sur le long terme démontrent l'efficacité de tels traitements face aux maladies génétiques; incluant cancers (Digiusto & Kiem, 2012), pathologies cardiaques (Xiao, 2011), syndromes d'immunodéficience (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2010; Aiuti *et al.*, 2012) et autres maladies neurodégénératives (Mittermeyer *et al.*, 2012).

2.1.1 Les acides nucléiques

Deux types d'acides nucléiques (ANs) sont principalement utilisés en thérapie génique, l'acide désoxyribonucléique (ADN), sous forme plasmidique (pDNA; de grande taille, circulaire et double-brin; exerçant son expression dans le noyau cellulaire) ou oligodésoxynucléotidique (ODN; de petite taille, rectiligne et double-brin; exerçant son expression dans le noyau cellulaire), et l'acide ribonucléique (ARN) en tant qu'ARN interférent (siRNA; de petite taille, rectiligne et double-brin; exerçant son effet de répression de l'information génétique dans le cytoplasme) ou d'ARN messager (mRNA; de grande taille, replié partiellement et simple-brin; sa traduction en protéines se faisant dans le cytoplasme) (Lächelt & Wagner, 2015). L'ADN, qui est connu depuis plus d'un demi-siècle comme porteur de l'information génétique peut, s'il est intégré au génome d'une cellule, conduire à la production ou à l'inhibition de certaines protéines et ainsi altérer l'état physiologique de cette cellule, ou à plus grande échelle, d'un tissu ou d'un organe. L'idée d'utiliser l'ADN comme médicament s'est donc imposée naturellement, le but final étant de parvenir à intégrer transitoirement les gènes d'intérêt dans le génome des cellules cibles et d'obtenir des taux d'expression de protéines, d'antigènes ou d'ARN suffisants pour produire un effet thérapeutique. La découverte en 1998 de l'ARN interférent par Fire et Mello (Fire *et al.*, 1998) a également ouvert la voie à d'autres stratégies thérapeutiques dans la catégorie des inhibiteurs de gènes. Des siRNAs

possédant une séquence particulière peuvent en effet cibler les mRNAs complémentaires et ainsi inhiber la traduction des protéines correspondantes. L'administration de siRNAs ciblée vers le cytoplasme des cellules pourrait donc empêcher la production de protéines anormales (ou surexprimées), notamment dans le traitement de cancers. Plus récemment, le design et la synthèse de mRNAs synthétiques qui sont traduits directement par la machinerie cellulaire et ce sans incorporation au génome, a servi à exprimer des protéines thérapeutiques afin de créer des vaccins contre les maladies infectieuses (Sahin *et al.*, 2014). Tout dernièrement, Doudna *et al.* ont présenté des éditeurs de gènes (CRISPR-Cas9) sous la forme d'endonucléases qui sont programmées pour altérer spécifiquement une séquence d'ADN afin d'en introduire une autre ayant un effet thérapeutique (Haurwitz *et al.*, 2010; Doudna & Charpentier, 2014). Cette stratégie permet de corriger les gènes responsables d'une maladie endogène et également de cibler précisément l'introduction d'un gène thérapeutique dans le génome. Les endonucléases responsables peuvent être introduites dans les cellules sous la forme d'ADN plasmidique qui sera ainsi transcrit, puis traduit par la machinerie cellulaire pour donner les protéines désirées (Gori *et al.*, 2015). L'expression "thérapie génique" sera ainsi utilisée comme terme générique désignant les techniques visant à utiliser des acides nucléiques, que ce soit de l'ADN ou de l'ARN comme principe actif et quel que soit leur mécanisme d'action.

2.1.2 Les contraintes de la thérapie génique

Aussi trivial que cela puisse paraître, l'utilisation d'acides nucléiques comme principe actif impose des contraintes bien différentes des médicaments classiques. De par ses cibles thérapeutiques, sa grande taille et sa fragilité, les ANs ne peuvent pas être administrés de façon polyvalente par les techniques classiques de pharmacie galénique, telles que la voie orale ou les injections parentérales (Pathak *et al.*, 2009). Selon le tissu ou l'organe à traiter, une grande variété de voies d'administration peut être employée en thérapie génique. Toutefois, l'administration systémique par voie intraveineuse, voire *per os*, des ANs et le ciblage spécifique des tissus ou organes à atteindre, demeure l'un des objectifs à atteindre en thérapie génique.

Les acides nucléiques, à cause de leur poids moléculaire important, diffusent mal à travers les fluides physiologiques concentrés en sels et protéines, comme le plasma et le cytoplasme, et traversent mal les matrices extracellulaires. De plus, leur nature polyanionique rend difficile leur entrée dans la cellule, dont la membrane externe est chargée négativement. Enfin, ils sont

rapidement dégradés par les DNases/RNases, enzymes présentes dans le plasma et le cytoplasme (Lächelt & Wagner, 2015). Les siRNAs et mRNAs présentent des contraintes identiques aux pDNAs, à la différence qu'ils sont beaucoup plus sensibles aux RNases, enzymes de dégradation présentes dans les milieux intra et extracellulaires (Sioud, 2005). Toutefois, leur cible finale est le cytoplasme et non le noyau, ce qui implique une barrière physique de moins à traverser comparé à leurs homologues plasmidiques.

L'administration systémique d'acides nucléiques doit ainsi faire face à de nombreuses barrières anatomiques et cellulaires, qui empêchent leur utilisation directe. Les différents moyens de protection des acides nucléiques seront exposés dans la section 2.1.3, traitant des vecteurs viraux et non viraux. À l'instar de leurs homologues viraux, nous verrons que les vecteurs non-viraux sont des particules colloïdales qui devront faire face à différentes contraintes tout au long de leur parcours, de l'injection jusqu'à la libération du matériel génétique.

2.1.3 Les vecteurs utilisés en thérapie génique

Outre les techniques de transfert de gènes par injection directe d'ANs « nus » dans les organes cibles ou encore les méthodes dites physiques (« Gene gun », électroporation, ultrasons, hydrodynamique), d'autres méthodes dites biologiques ou chimiques ont été conçues à travers ce qu'on appelle les vecteurs (Gao *et al.*, 2007). Un vecteur doit être biocompatible et non-toxique, *a fortiori* non- voire faiblement cytotoxique et bien sûr biodégradable. Enfin, le vecteur idéal doit être peu onéreux à produire. Les techniques physiques de transfert de gènes ne seront pas traitées ici, par contre on dénombre deux grandes catégories de transporteurs : les vecteurs viraux et les vecteurs non-viraux. Une liste non-exhaustive des différentes techniques de livraison de gènes médicaments est disponible en ANNEXE A.

2.1.3.1 Les vecteurs viraux

Par leur nature même, les virus possèdent les fonctions nécessaires à transférer du matériel génétique dans le noyau d'une cellule eucaryote et permettent son intégration au génome de l'organisme infecté afin d'assurer leur propre réplication (Nayerossadat *et al.*, 2012). Il a donc été envisagé d'utiliser des virus modifiés afin de transmettre du matériel génétique sain à des patients. Rosenberg *et al.* ont utilisé un rétrovirus modifié pour introduire un gène de résistance à la néomycine dans des "tumor-infiltrating lymphocytes" (TIL) afin d'utiliser ce gène comme

marqueur des cellules transfectées (Rosenberg *et al.*, 1990). Ce premier essai de thérapie génique a démontré l'efficacité des vecteurs viraux pour la transfection d'ANs et a ouvert la porte à l'utilisation de virus pour la thérapie génique. Trois types de virus sont principalement utilisés : Les rétrovirus, les adénovirus et les virus adéno-associés (Nayerossadat *et al.*, 2012).

D'une manière générale, les vecteurs viraux, malgré des taux de transfection intéressants, sont limités par la faible quantité d'information génétique qu'ils portent et posent de sérieux problèmes immunologiques (Guo & Huang, 2012). Ainsi la production de vecteurs viraux nécessite une modification des souches sauvages de virus par génie génétique afin de leur retirer leurs propriétés infectieuses. Des technologies de pointe sont évidemment nécessaires à la construction de tels virus modifiés, ce qui fait des vecteurs viraux des outils très coûteux à produire.

2.1.3.2 Les vecteurs non viraux

Contrairement à leurs homologues viraux, les vecteurs non-viraux ne présentent pas de risques infectieux, ni de risques de mutagénèse. Les réponses immunitaires qu'ils sont susceptibles de provoquer sont également moindres et sont surtout fonction du vecteur utilisé (Ramamoorth & Narvekar, 2015). Les vecteurs non-viraux ne sont pas limités par la taille des plasmides qu'ils peuvent contenir, ce qui les rend plus polyvalents que les virus (Verma & Somia, 1997). En revanche, l'utilisation des vecteurs non-viraux est limitée par l'affranchissement des barrières extra et intracellulaires rencontrées *in vivo* (section 2.3.2), telles que la stabilité colloïdale dans la circulation sanguine, les phénomènes d'adsorption protéique permettant leur reconnaissance par le système immunitaire ainsi que leur faculté à être internalisé dans les cellules cibles (Mintzer & Simanek, 2009).

On recense 5 grandes catégories de vecteurs synthétiques destinés à la livraison de gènes médicaments par voie systémique : Les vecteurs lipidiques, les dendrimères, les polypeptides, les nanoparticules (Quantum dots et nanotubes de carbone) et les vecteurs polymériques. Avec les vésicules lipidiques, cette dernière catégorie constituent la majeure partie des vecteurs synthétiques à l'étude (Mintzer & Simanek, 2009). Les polymères cationiques présentent une toxicité moindre que leurs homologues lipidiques, par contre ils sont connus pour avoir plus de difficulté à être internalisés dans les cellules cibles (Al-Dosari & Gao, 2009).

Le Tableau 2.1 et la Figure 2.1 recensent les principaux vecteurs de type polymères cationiques tels que la poly(L-lysine) (PLL; (Mintzer & Simanek, 2009)), la poly(éthylèneimine) (PEI; (Boussif

et al., 1995)), le poly(méthacrylate) (PDMAEMA; (van de Wetering *et al.*, 1999)) et les polymères dérivés des sucres (β -cyclodextrine (Davis, 2009) et chitosane (Buschmann *et al.*, 2013)). Leurs différentes modifications chimiques et autres combinaisons de copolymères n'y sont pas citées. Les efficacités de transfection *in vitro* sont données en comparaison aux résultats obtenus avec les agents de transfection commerciaux tels que la Lipofectamine™ (pDNAs) ou le DharmaFECT® (siRNAs) sur les cellules étudiées.

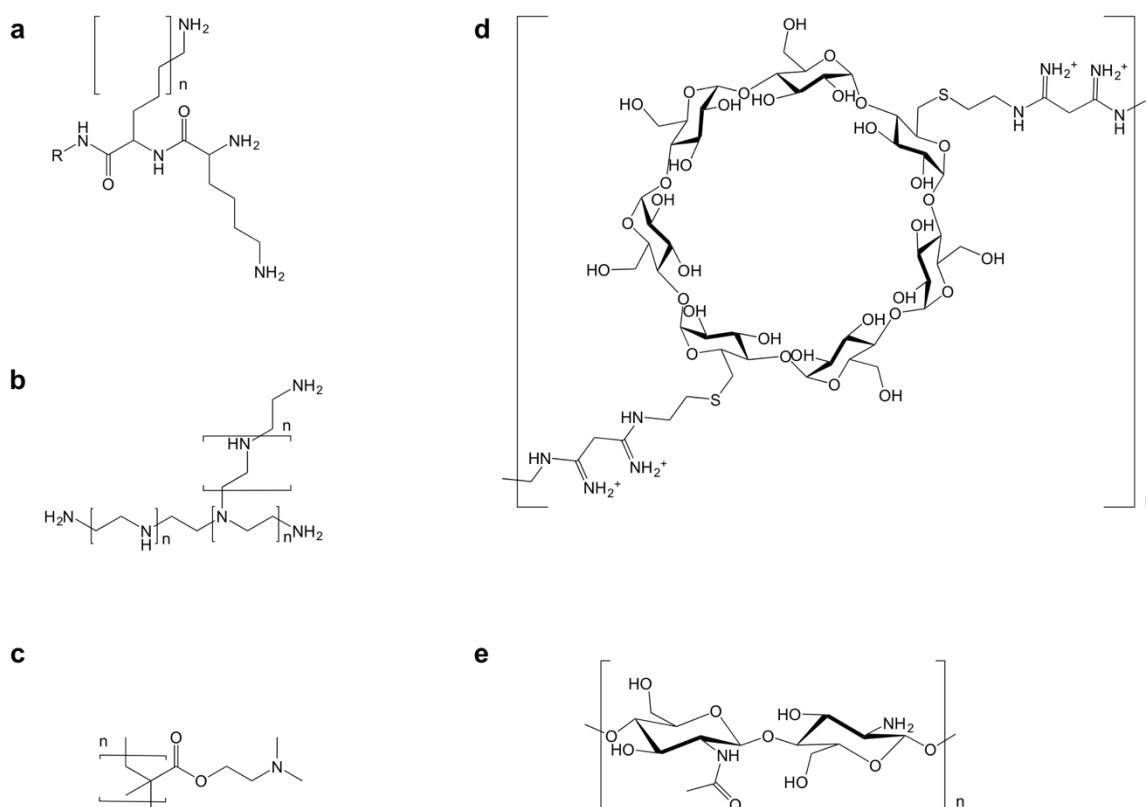


Figure 2.1 : Exemples de polymères cationiques utilisés pour la livraison d'ADN médicament ; a) Poly(L-Lysine) (PLL), b) Poly(éthylèneimine) branché (bPEI), c) poly(2-diméthylaminoéthyl) méthacrylate (PDMAEMA), d) Cyclodextrine avec son espaceur cationique diméthylsuberimide, e) Chitosane (CS).

Idéalement, les vecteurs destinés à la thérapie génique devraient avoir les qualités suivantes : 1) Être composé exclusivement de matériaux biocompatible et biodégradables ; 2) Disposer d'une faculté de ciblage spécifique pour un tissu / organe donné, assurant l'action thérapeutique à un endroit spécifique tout en préservant les tissus sains aux alentours ; 3) Être éliminé par l'organisme

dans un laps de temps suffisant pour qu'il y ait activité thérapeutique sans observer de dangereux phénomènes d'accumulation irréversible dans les tissus (Nie, 2010). Nous verrons dans les prochains chapitres que le chitosane, polymère cationique utilisé au sein de notre laboratoire, ainsi que les polyplexes chitosane - acides nucléiques sont en mesure de rencontrer ces prérequis.

Tableau 2.1 : Liste non-exhaustive des polymères cationiques destinés à la livraison d'ADN médicamenteux.

Polymère Cationique	Origine	Liaison à l'ADN	Aspect (Taille, Forme)	Avantages	Limitations
Poly(L-Lysine) PLL	Polymérisation d'un anhydride de L-Lysine dont l'amine terminale est protégée	Electrostatique via Amines I (pKa=10.2)	<ul style="list-style-type: none"> - Mn > 3 kDa - Linéaire et branché 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de complexes stables pour Mn élevés - Modifications possibles via formation de copolymères (grafts), PEGylation, Ligands, etc. 	<ul style="list-style-type: none"> - Translocation nucléaire impossible pour Mn élevés - Cytotoxicité - Agrégation <i>in vivo</i>
Poly(éthylèneimine) PEI	<ul style="list-style-type: none"> - Polymérisation de la 2-éthyl-oxazoline (linéaire) - Polymérisation de aziridine 	Electrostatique via Amines II (pKa=5.7-7.5 selon la forme)	<ul style="list-style-type: none"> - Mn = 5-25 kDa - linéaire et branché 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de transfection élevé <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> - Haute densité de charges - Haut pouvoir tampon à pH physiologique - Efficace <i>in vivo</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Haute cytotoxicité - Forme linéaire instable vs. Forme branchée stable - Agrégation <i>in vivo</i>
Polyméthacrylate PDMAEMA	Polymérisation du méthacrylate de 2-(diméthylamino) ethyle	Electrostatique via Amines III (pKa=7.5)	<ul style="list-style-type: none"> - Mn > 300 kDa - linéaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de transfection élevé <i>in vitro</i> - Haut pouvoir tampon - Cytotoxicité acceptable - Modifications possibles par remplacement de l'amine III par d'autres fonctions chimiques 	Faible transfection <i>in vivo</i>
β-cyclodextrine incorporées à des polymères cationiques	Polymérisation de (2-aminoethanethio)-β-cyclodextrine et d'un espaceur (dimethylsuberimidate)	Electrostatique via Amines (souvent ammoniums) des espaceurs	<ul style="list-style-type: none"> - Plusieurs monomères de cyclodextrine reliés par des espaceurs (Mn=3-9 kDa) - Linéaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Biocompatible - Faible cytotoxicité - Taux de transfection élevé <i>in vitro</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de transfection moyen <i>in vivo</i> - Chimie importante quant à la préparation du copolymère
Chitosane	Naturelle, via desacétylation de la chitine et/ou dépolymérisation	Electrostatique via Amines I (pKa=5.5-6.5)	<ul style="list-style-type: none"> - Mn=10-200 kDa - Linéaire 	<ul style="list-style-type: none"> - Bons taux de transfection <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> - Biodégradable - Biocompatible - Faiblement cytotoxique - Antibactérien - Modifications possibles de la chaîne 	<ul style="list-style-type: none"> - Cytotoxique quand complètement desacétylé - Chimie difficile car faible solubilité en solvants organiques - Agrégation <i>in vivo</i>

2.2 Le chitosane

Parmi les polymères cationiques, les vecteurs dérivés du chitosane (CS) recueillent un intérêt particulier du fait qu'ils sont d'origine naturelle tout en étant biocompatibles, biodégradables, mucoadhésifs et non-toxiques (Kean & Thanou, 2010; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012). Le chitosane, polysaccharide composé des unités N-glucosamines et N-acétyl-glucosamines, a été approuvé pour son usage biomédical ; Notamment pour l'aide à la réparation du cartilage avec un biomatériau développé par notre groupe (Biomaterials and Cartilage Laboratory) puis par Piramal Healthcare Canada, à savoir : le BST-CarGel (Chevrier *et al.*, 2011). Depuis plus de 10 ans, l'étude approfondie du CS a permis de considérer cette famille de polymères en tant que système de livraison (Lavertu, M. *et al.*, 2006; Malmo *et al.*, 2012; Buschmann *et al.*, 2013). En effet, aux vues de plus de 650 entrées de 2011-2016 (selon SciFinder au 1^{er} Septembre 2016), le CS demeure l'un des polymères cationiques les plus utilisés pour la livraison d'acides nucléiques.

2.2.1 Origines

La chitine et son dérivé le chitosane constituent, après la cellulose, le deuxième polysaccharide le plus abondant sur Terre (insectes, crustacés et champignons). On les trouve naturellement sous forme linéaire et sont composés d'unités 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose et 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose liées par une liaison glycosidique de type $\beta(1\rightarrow4)$ (Figure 2.2).

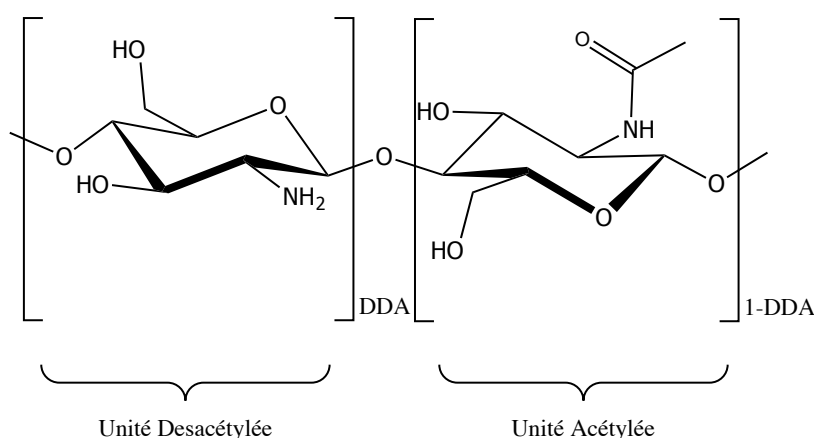


Figure 2.2 : Représentation chimique du Chitosane, mettant en scène ses deux unités caractéristiques (2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose et 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose reliées par une liaison glycosidique de type $\beta(1\rightarrow4)$).

La différence entre ces 2 polymères naturels s'explique par leur teneur en unités désacétylées, appelé le degré de désacétylation (DDA). On assume que lorsque plus de 50% des unités présentes dans une chaîne de chitine sont désacétylées, on parle de chitosane (Rinaudo, 2006).

2.2.2 Préparation

2.2.2.1 Désacétylation de la chitine

Le CS est en général préparé par désacétylation alcaline de la chitine. Les propriétés du CS résultant vont être affectées par l'origine de la chitine (insectes, crustacés, champignons) et par la méthode utilisée, notamment au niveau de la distribution des acétyles le long de la chaîne (répartition en bloc ou aléatoire (Sashiwa & Aiba, 2004)).

Le traitement réalisé au sein de notre laboratoire est typiquement : NaOH 25% w/w; chitosane 2% w/w; T=110°C. Le temps de réaction (plus ou moins long) permettra l'ajustement du DDA (plus ou moins élevé) et ce en fonction du DDA initial du CS/Chitine à désacétyler.

2.2.2.2 Dépolymérisation du chitosane

Plusieurs études ont mis en avant le rôle de la taille des chaînes de CS dans la livraison d'acides nucléiques (ANs) (Lavertu, M. *et al.*, 2006; Strand *et al.*, 2010; Alameh *et al.*, 2012). Il est ainsi nécessaire de couper les chaînes de CS (dépolymérisation) afin d'obtenir des glycopolymères adaptés à cet effet. La coupure se fait au niveau de la liaison glycosidique et peut être réalisée de façon chimique ou enzymatique (via des « Chitosanases » ; Non traité dans ce rapport).

Outre le classique traitement à l'acide chlorhydrique concentré (HCl), efficace mais difficilement contrôlable et qui a l'inconvénient d'augmenter le DDA par désacétylation (Vårum *et al.*, 2001); le traitement à l'acide nitreux (HONO) est la technique la plus couramment utilisée. En effet, la dépolymérisation par HONO permet une sélectivité de coupure en réagissant avec les amines désacétylées; et ce à moindres coûts (Allan & Peyron, 1995a, 1995b). Notons que la purification du CS ainsi obtenu est très aisée, du fait de la nature des produits annexes de la réaction (N_2 , H^+ et H_2O). Un autre avantage de ce procédé chimique sur le CS est l'apparition d'un mannose terminal portant une fonction aldéhyde, fonction chimique additionnelle susceptible d'être utilisée afin de modifier le CS (Figure 2.3).

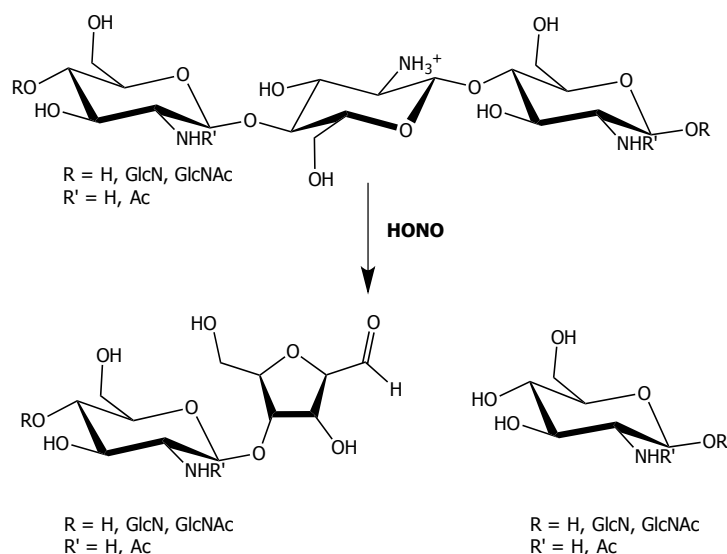


Figure 2.3 : Réaction de dépolymérisation du Chitosane par l'acide nitreux (HONO). La liaison glycosidique y est coupée par l'acide nitreux, libérant ainsi 2 chaînes plus courtes, dont l'une porte une extrémité réductrice 2,5-anhydro-D-mannose (GlcN = Glucosamine; GlcNAc = N-acétylglucosamine; Ac = Acétyle).

2.2.3 Caractérisation physico-chimique

Des analyses chimiques précises et approfondies du CS sont donc de mise pour la production de tels biomatériaux afin de d'assurer répétabilité et reproductibilité des résultats. Les facteurs les plus importants à déterminer sont le degré de désacétylation (DDA) et le poids moléculaire du polymère (M_n et M_w), facteurs influençant grandement la livraison d'acides nucléiques (Huang *et al.*, 2005).

2.2.3.1 Le degré de désacétylation (DDA)

Le DDA reflète la proportion d'amines, qui une fois protonnées, sont susceptibles d'interagir avec les groupes phosphates des ANs par liaison électrostatiques. On ne parlera pas ici de la distribution des acétyles, qu'elle soit aléatoire ou en bloc. Le DDA influence la dégradabilité du CS, son caractère inflammatoire et immunogène (Jean *et al.*, 2009; Hoemann *et al.*, 2010). Ainsi parmi plusieurs moyens d'analyse du DDA (spectroscopie infrarouge -IR- et titrages à la ninhydrine et à l'ultraviolet -UV- ; résonance magnétique nucléaire en solution ^1H , ^{13}C , ^{15}N - et à l'état solide -CP-MAS-), on privilégiera les techniques UV et ^1H RMN. Cependant l'analyse UV en plus d'être

affectée par la teneur en H₂O du CS, nécessite une courbe de calibration et risque d'être perturbée par la présence de protéines/peptides résiduels issus de l'extraction de la chitine (Kasaai, 2009).

Lavertu *et al.* proposèrent une méthode spectroscopique, par résonance magnétique nucléaire (¹H RMN), ne nécessitant aucune coupure (= dépolymérisation) du polymère préalable contrairement aux méthodes déjà existantes (Lavertu, M. *et al.*, 2003). Le CS considéré est alors analysé tel quel, quelle que soit sa taille, selon l'équation suivante :

$$\%DDA = \left(\frac{H_{1D}}{H_{1D} + \frac{H_{Ac}}{3}} \right) \times 100$$

Les termes H_{1D} et H_{Ac} réfèrent respectivement aux intégrations des pics de protons H1 de l'unité désacétylée et aux 3 protons de l'acétyle (Figure 2.4 et Figure 2.5).

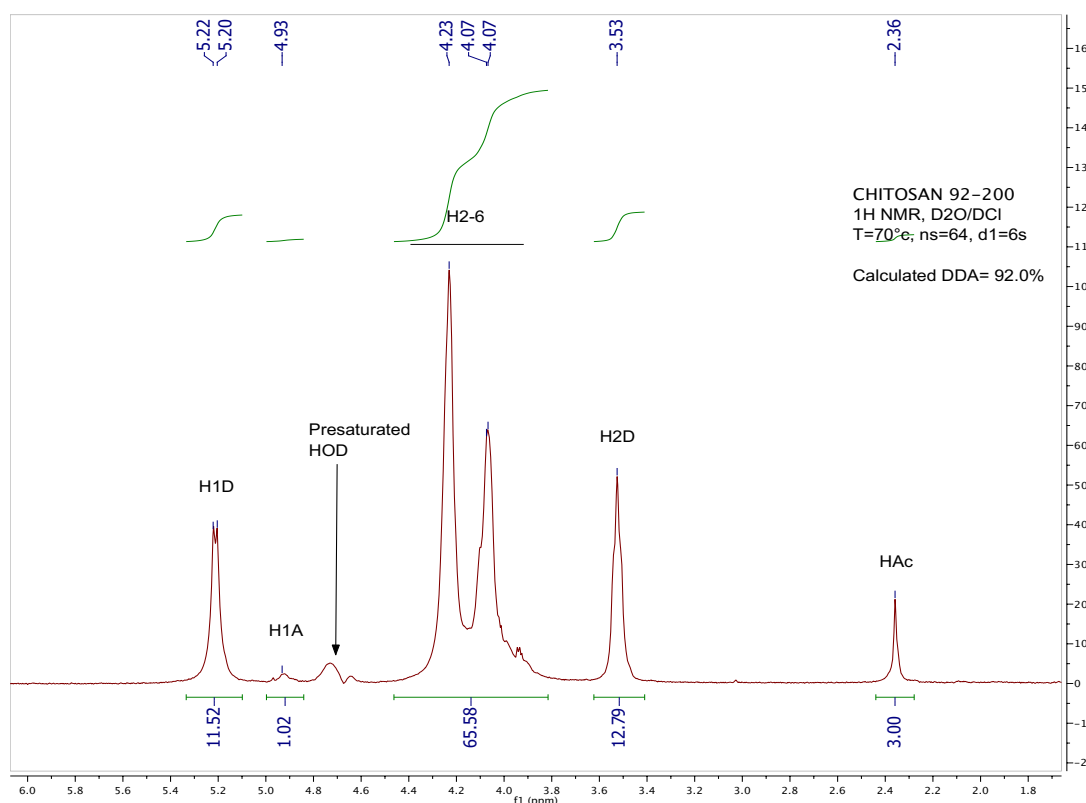


Figure 2.4 : Analyse RMN ¹H d'un chitosane à 92% de DDA, le pic HOD n'apparaît pas car il a été présaturé (= irradié) pour obtenir une meilleure définition des pics. Le chitosane a été préalablement dissout dans un mélange D₂O/DCI (20 :1), avant d'être analysé à 70°C afin de

décaler le pic H1D de celui du HOD. 64 scans ont été effectués avec un temps de relaxation fixé à 6s et un temps d'acquisition de 2s, temps nécessaire à la relaxation complète des spins des protons étudiés.

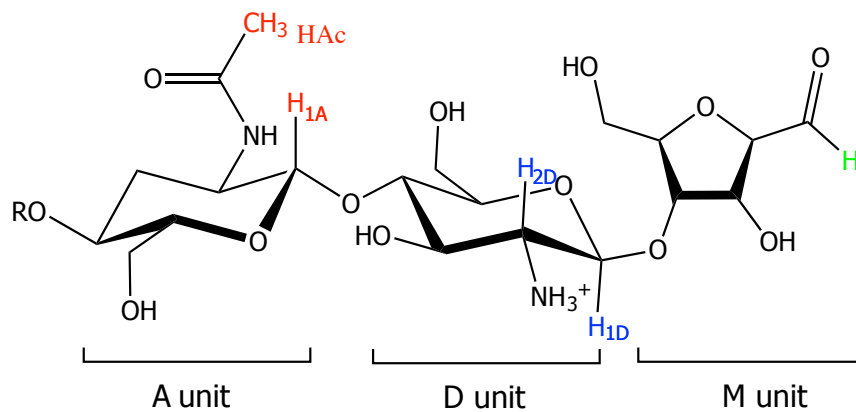


Figure 2.5 : Représentation schématique des principaux protons du chitosane situés sur les unités acétylées (A unit) et désacétylées (D unit). Le mannose terminal formé suite à la réaction de dépolymérisation à l'acide nitreux porte le nom de M-Unit.

2.2.3.2 Masse molaire

Les masses molaires du CS (moyenne en masse M_w et moyenne en nombre M_n) sont des facteurs importants à considérer lors de la formation de nanoparticules (NPs) avec les ANs. M_n indique le nombre de monomères moyen par chaîne et permet avec M_w le calcul de l'indice de dispersité (PDI) du polymère qui reflète sa distribution en taille et donc de son uniformité. La méthode pour se faire est l'utilisation de chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à un détecteur à diffusion de lumière statique (MALS). La SEC est un type de chromatographie liquide qui sépare les analytes en fonction de leur volume hydrodynamique.

Couplé à un réfractomètre, ce système permet (à partir de la théorie de la diffusion statique de la lumière) l'obtention des masses molaires moyennes en masse et en nombre (respectivement M_w et M_n), du PDI ainsi que du rayon de gyration (r_g) (Buschmann *et al.*, 2013).

2.2.4 Modifications chimiques

De nombreuses modifications chimiques ont été apportées au CS, que ce soit à des fins de purification de l'eau, à des fins cosmétiques ou pour la livraison d'acides nucléiques (Rinaudo,

2006; Buschmann *et al.*, 2013). Seules les modifications de CS destinées à des applications de livraison d'ANs seront traitées dans cette section. Trois grands types d'améliorations ont été recensées dans la littérature : L'augmentation de la solubilité du CS en conditions physiologiques (pH 7.4), notamment par quaternisation (Sieval *et al.*, 1998) ou encore par addition de PEG (Casettari *et al.*, 2012); Le greffage de ligands spécifiques tels que le galactose (foie), la transferrine (endocytose), le folate (endocytose) (Kim, T.-H. *et al.*, 2007); Enfin le CS a été modifié par couplage avec des molécules chargées positivement (arginine (Morris & Sharma, 2010b), histidine (Morris & Sharma, 2010a), imidazole (Moreira *et al.*, 2009) et PEI (Jiang, H.-L. *et al.*, 2007)).

De telles modifications se font majoritairement sur les fonctions les plus réactives des monomères du CS, soient les amines en C2 et les hydroxyles en C6. Nous verrons dans la section 2.4, qui concerne la PEGylation du CS, les limitations de ces types de greffage pour la livraison de matériel génétique ainsi que les autres alternatives possibles d'attache sur le CS.

2.3 Vectorisation d'acides nucléiques par le chitosane

Les polyplexes de chitosane – acide nucléique (CS-AN), tout comme les polyplexes préparés avec d'autres polymères cationiques, sont issus du mélange rapide de solutions diluées de polyélectrolytes de charges opposées (Dautzenberg & Jaeger, 2002). Le complexe polyélectrolyte résultant est ainsi formé spontanément via interactions électrostatiques (Figure 2.6).

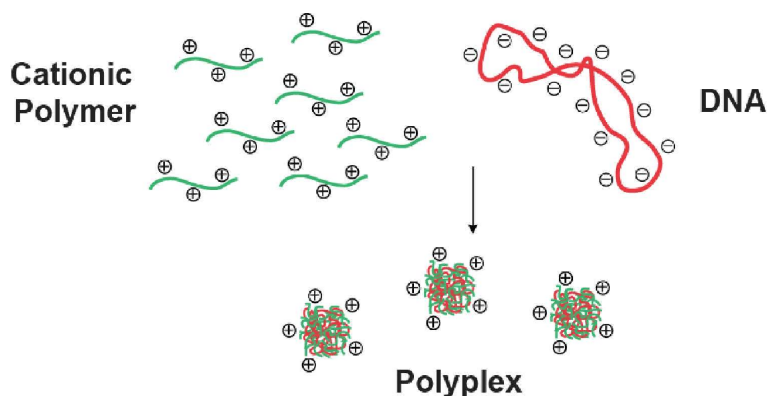


Figure 2.6 : Représentation schématique de la formation de polyplexes par complexation entre un polymère cationique (CS) et un ADN plasmidique (pDNA) via interactions électrostatiques. Figure inspirée de Kohman *et al.* (Kohman, 2009).

Les propriétés de telles nanoparticules (NPs) (taille, forme, charge, etc.) sont influencées par plusieurs paramètres, tels que : la longueur du polyélectrolyte ainsi que sa répartition et sa densité de charge, la stœchiométrie des espèces en présence (rapport N:P), le procédé de mélange (faible concentration des espèces, vitesse de mélange), le pH et la force ionique du milieu (Thünemann *et al.*, 2004).

2.3.1 Propriétés physico-chimiques et caractérisation des polyplexes

Une caractérisation complète et approfondie des polyplexes ainsi formées est primordiale quant à la répétabilité et la compréhension des résultats de transfection *in vitro* et *in vivo*. Une liste des paramètres importants à contrôler est présentée ici, tels que : la taille des polyplexes, leur charge surfacique, leur stabilité et leur pouvoir tampon.

2.3.1.1 La taille des polyplexes

La taille des polyplexes représente un des facteurs déterminants quant à leur efficacité thérapeutique. On admet que des particules ayant un diamètre autour de 100 nm sont capables de traverser la plupart des barrières biologiques (Davis, 2009). De plus, la taille de ces structures influe sur le type de protéines qui s'adsorbe sur leur surface, facilitant ou ralentissant tout échange avec l'environnement pouvant provoquer leur élimination prématurée *in vivo* (Lundqvist *et al.*, 2008).

La taille des NPs CS-AN peut être déterminée par différentes méthodes telles que : la diffusion de lumière dynamique (DLS), la microscopie électronique (ESEM, TEM), l'ultracentrifugation (AUC) ou encore la « Nanoparticle Tracking Analysis » (NTA) (Buschmann *et al.*, 2013).

La taille des particules colloïdales obtenues va dépendre de leur méthode de préparation. En effet, des tailles de polyplexes chitosane-ARN interfèrent (CS-siRNA) variant d'un facteur 5 ont été mesurées dépendamment de leur concentration en acide nucléique lors du mélange (Nielsen *et al.*, 2010; Malmo *et al.*, 2012). Ce phénomène est certainement dû à la faible présence de charges négatives pouvant être liées au CS. Il s'agirait d'un équilibre qui est atteint à partir d'un certain ratio N:P au sein du complexe, noté $N:P_{int}$. Rappelons que le rapport N:P est le rapport amines/phosphate (respectivement charges positives/charges négatives) observé pour les polyplexes. On différenciera le rapport $N:P_{prep}$ lors de la préparation ($N:P_{prep} = 5$ pour nos formulation avec de l'ADN plasmidique (pDNA) et $N:P_{prep} = 2$ ou 5 pour les particules avec siRNA) des polyplexes de celui correspondant à la stœchiométrie interne des complexes CS-NA : $N:P_{int} = 1.3-1.6$ pour les particules CS-pDNA, déterminé par Orange II (Ma *et al.*, 2010); $N:P_{int} = 1.3 \pm 0.1$ pour les polyplexes CS-ODN, déterminé par AUC et DLS (Niebel *et al.*, 2014)).

L'augmentation de la masse molaire du CS utilisé serait lui susceptible d'augmenter la taille des complexes CS-pDNA (MacLaughlin *et al.*, 1998). Par contre, à ma connaissance, encore aucune étude n'a été réalisée à ce jour concernant l'influence de la masse molaire du CS sur la taille des NPs respectant la même méthode de préparation. Les mêmes constatations ont été faites sur les polyplexes CS-siRNA (Malmo *et al.*, 2012).

D'autres études ont montré que la taille des particules CS-pDNA augmente lorsque le DDA du CS considéré diminue (Strand *et al.*, 2005). En effet le CS est un polymère relativement rigide du fait de ses charges latérales positives qui se repoussent entre elles et des nombreuses liaisons hydrogènes (liaisons H) qui stabilisent cette structure. Cette rigidité dépend également du nombre

de groupes acétyles présents (Romoren *et al.*, 2003). Lors de sa compaction avec de l'acide nucléique, le CS va alors perdre une partie de sa rigidité (la composante due aux charges), mais conserve la rigidité due aux groupements acétylés et aux liaisons H. Une autre explication à cette augmentation de taille avec le DDA serait la modification du rapport $N:P_{int}$ en fonction du DDA. En effet, un équilibre est atteint concernant la stœchiométrie interne des complexes lors de leur formation. Cet équilibre, donc le rapport $N:P_{int}$, varie en fonction du DDA du CS utilisé. Plus le DDA est faible, plus il va falloir de CS (charges positives) pour atteindre cet équilibre interne (Ma *et al.*, 2009) et donc plus la particule sera importante en taille.

Cette observation de l'influence du rapport $N:P_{int}$ est valable également sur le rapport $N:P$ utilisé lors du mélange, $N:P_{prep}$. Plus le rapport $N:P_{prep}$ est élevé, plus la taille des polyplexes sera grande (MacLaughlin *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2001; Malmo *et al.*, 2012). Ce phénomène n'est cependant plus valable pour des ratios $N:P_{prep}$ faibles, un nombre minimum de chaînes de CS étant nécessaires pour former des polyplexes stables avec de l'acide nucléique.

Enfin, le type d'acide nucléique à protéger ainsi que sa séquence ont leur importance sur la taille de la NP finale. En effet, les siRNAs / ODNs ont une taille 100 fois inférieure à celle des pDNAs et les NPs résultantes sont dans la majeure partie des cas inférieures en taille. Ainsi des polyplexes préparés de façon identique avec un CS 92-10 (92% de DDA et $M_n = 10$ kDa) avec un ratio $N:P_{prep} = 5$ à pH 6.5, ont un diamètre d'environ 50-60 nm en utilisant des ODNs (mesuré par DLS et ESEM) (Alameh *et al.*, 2012); alors que des diamètres supérieurs à 200 nm ont été mesurés par DLS pour les polyplexes formés via pDNAs (Nimesh *et al.*, 2010).

2.3.1.2 La charge surfacique des polyplexes

Lors de la formation des NPs via polyélectrolytes, il se formerait un cœur neutre (les charges étant nulles au centre de la NP à cause de la complexation) et une périphérie chargée positivement (à cause de l'excès de CS dans la formulation). Les polyplexes CS-AN portent ainsi une charge résiduelle positive à pH acide. Par contre à pH physiologique (pH 7.4), la densité de charges en surface des polyplexes CS-AN se fait beaucoup moins importante (le pK_a des amines du CS variant de 5.5-6.5 (Filion *et al.*, 2007)), ce qui altère leur stabilité colloïdale. Ainsi un rapport $N:P$ de préparation ($N:P_{prep}$) égal à 1 provoquerait une précipitation irréversible des polyplexes formés, phénomène dû à l'absence de répulsions électrostatiques.

Notons que, *in vitro*, cet excès de charges positives est non seulement nécessaire à la stabilité colloïdale des NPs, mais facilite également leur entrée dans la cellule par interaction avec le glycocalyx chargé négativement (couche externe de la membrane cellulaire jouant un rôle dans la protection, dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion cellulaire et dans les processus infectieux). Par contre, cet excès de charges positives sera néfaste à une utilisation *in vivo*, les corps étrangers chargés positivement étant « reconnus » plus facilement par les opsonines et soumis au traitement du système réticulo-endothélial (RES) ((Zamboni *et al.*, 2012); cf. section 2.3.2.1).

2.3.1.3 La stabilité des polyplexes

L'affinité relative entre le CS et l'AN pour la formation de NPs reflète la capacité du CS à protéger l'ADN, elle détermine donc la stabilité des polyplexes. La stabilité des polyplexes quant à elle est intimement corrélée à l'efficacité de transfection (Lavertu, M. *et al.*, 2006). La particule devra être stable dans le but de protéger l'information génétique, mais l'affinité entre le CS et l'AN ne devra pas être trop importante pour permettre la libération de l'AN dans le milieu intracellulaire (Koping-Hoggard *et al.*, 2004).

En effet les polyplexes formés à partir de CS à faible DDA, faible Mn et faible rapport N:P_{prep} se dissocient facilement en présence d'héparine (Klausner *et al.*, 2010). L'héparine, en tant que polymère anionique, est susceptible de déplacer plus ou moins facilement l'acide nucléique au sein du polyplexe, dépendamment de l'affinité entre le CS et l'AN.

En plus d'être dépendante de la structure du CS, la stabilité des complexes (formés par interactions électrostatiques) est également fonction de la force ionique et du pH du milieu de préparation (Ma *et al.*, 2009). On peut alors dire que la constante d'affinité entre le CS et l'AN augmente lorsque le pH et la force ionique diminuent ; et lorsque la taille et le DDA du CS augmentent.

2.3.1.4 Le pouvoir tampon des polyplexes

Le pouvoir tampon des polyplexes est lié directement au type de polyélectrolyte utilisé. Les polycations ayant un fort pouvoir tampon dans les zones de pH endosomales (pH 4.5-7) sont connus pour être de bons vecteurs de transfection car ils ont la capacité de sortir de l'endosome en activant le mécanisme d'éponge à protons ((Fuller *et al.*, 2008; Li, Y. *et al.*, 2012); cf. section 2.3.2.5). Longtemps comparé au poly(éthylènimine) (PEI) en termes de concentration massique de polymère, le CS semblait avoir un pouvoir tampon inférieur suggérant que le mécanisme de sortie

de l'endosome des particules de CS-NA n'est pas l'effet d'éponge à proton (Mao *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2009). Les polyplexes se formant à un rapport $N:P_{\text{prep}}$ précis et non en fonction de la masse de chaque entité, il est donc légitime de comparer les pouvoirs tampon d'un point de vue molaire. Notre groupe a démontré que d'un point de vue de concentration molaire en amines protonables, le CS possède un pouvoir tampon supérieur à celui du PEI dans les gammes de pH endosomales (Richard *et al.*, 2013).

2.3.2 Devenir des polyplexes *in vivo* après administration

Lors d'une administration systémique, les NPs (polyplexes et autres vecteurs non-viraux) devront faire face à de nombreuses barrières, telles que : l'adsorption protéique et l'effet Vroman, la concentration en sels dans la circulation sanguine, le passage des membranes biologiques et cellulaires, la séquestration dans l'endosome, la circulation intracytoplasmique et pour la livraison de pDNAs il y aura dans certains cas le passage de la membrane nucléaire (Figure 2.7).

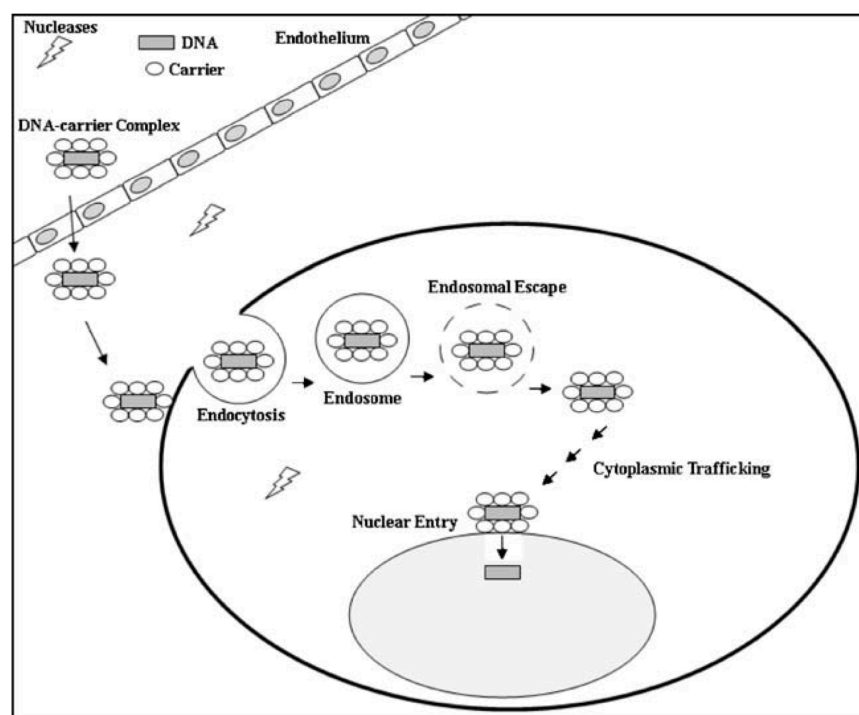


Figure 2.7 : Représentation schématique des contraintes rencontrées lors de la livraison d'acides nucléiques *in vivo* : Au niveau du plasma sanguin (Opsonines, enzymes de dégradation, concentration en sels), de la traversée des tissus biologiques et de la membrane cellulaire, de la sortie de l'endosome, du trafic intracellulaire, de la dissociation des complexes et pour les pDNAs seulement, l'entrée du matériel génétique dans le noyau. Figure issue de Al Dosari *et al.* (Al-Dosari & Gao, 2009).

2.3.2.1 Adsorption protéique et effet Vroman

Depuis les années '60 et ce jusque dans les années '80, Vroman *et al.* étudièrent les interactions entre le sang et ses composants avec des surfaces planes de verre (hydrophobes). Ils démontrèrent que parmi toutes les protéines plasmatiques (PPI) composant le plasma sanguin (Albumine, IgG, fibrinogène, etc.), le fibrinogène semble avoir la meilleure adsorption par la surface considérée. Par contre lors d'une exposition prolongée de cette surface au plasma sanguin, le fibrinogène se voit remplacé par d'autres PPI via ce qu'ils ont nommé le phénomène de « conversion » (Vroman, 1964; Vroman & Adams, 1969; Vroman *et al.*, 1980). Ce phénomène de compétition d'adsorption entre PPI pour diverses surfaces (les plus abondantes se greffent en premier, puis seront remplacées par des PPI de meilleure affinité avec la surface) a ensuite été étudié par de nombreux groupes sous le nom d'effet Vroman. Dans les années 2000, avec l'essor des nanotechnologies et afin de déterminer l'impact des nanostructures dans un environnement physiologique, Cedervall *et al.* étudièrent les interactions entre nanoparticules (NPs) et systèmes biologiques. Ils démontrèrent que les PPI entrent en compétition pour adhérer la surface des NPs, formant une couronne protéique qui déterminera l'identité biologique et donc le devenir de la NP modifiée, à savoir : une diminution de la stabilisation stérique et une élimination prématurée des particules de l'organisme, le déclenchement de la cascade immunitaire par activation du complément, voire encore l'adhésion spécifique d'Immunoglobuline G (IgG) qui vont activer la reconnaissance par les cellules immunitaires et déclencher une réaction allergique (Walkey & Chan, 2012). Ils envisagèrent alors que, dans les milieux biologiques, les surfaces de NPs habillées de PPI peuvent être divisées en deux familles : La couronne dite « douce » dans laquelle prédomine un échange dynamique rapide entre les biomolécules (PPI) à la surface de la NP et la couronne dite « dure » au sein de laquelle les biomolécules ont une plus grande affinité pour la surface de la NP, phénomène réduisant considérablement les échanges protéiques en surface. Ils démontrèrent également que la nature des protéines impliquées (notons que plusieurs types protéiques peuvent être présents sur une même NP) et leur affinité relative pour la surface du nanomatériau considéré va dépendre des caractéristiques de ce dernier (Cedervall, Lynch, Foy, *et al.*, 2007; Cedervall, Lynch, Lindman, *et al.*, 2007; Lundqvist *et al.*, 2008).

En effet, les taux d'association (adsorption) et de dissociation (désorption) de ces PPI varient en fonction de la nature des protéines en compétition (dépendante du milieu concerné ; sang, cytoplasme et autres liquides physiologiques), de la composition physico-chimique (taille, forme,

composition, chimie et charges de surface) des NPs et du temps d'exposition requis pour atteindre un équilibre thermodynamique. En 2007, Cedervall *et al.* rapportèrent que le nombre de PPI adsorbées à surface de NPs (NIPAM/BAM) augmente avec l'hydrophobicité et la taille des NPs. Les taux d'échange (adsorption / désorption) semblent dépendre également du caractère hydrophobe (composition moléculaire) de la surface de la NP ainsi que de la nature et de l'affinité des PPI pour la surface à recouvrir (Cedervall, Lynch, Lindman, *et al.*, 2007). En 2008, Lundqvist *et al.* étudièrent l'influence de la taille (50-100 nm de diamètre) et de la charge de surface (positive, neutre ou négative) des particules considérées sur la formation et sur la qualité de la couronne protéique. La charge de surface de telles nanostructures n'aurait a priori aucun impact significatif sur l'adhésion des PPI les plus abondantes et n'ayant aucun rôle biologique particulier (ex: albumine, lipoprotéines, fibrinogène). Néanmoins, la charge de surface (couplée à la taille, donc la quantité de charges) de la NP serait responsable du recrutement spécifique de telle ou telle PPI (Lundqvist *et al.*, 2008). L'influence de la charge de surface des NPs a également été rapportée par Casals *et al.* en 2010; alors que leurs particules d'or natives (10 nm de diamètre, composition différente de taille inférieure au NPs de Lundqvist *et al.*) se voient recouvertes essentiellement d'albumine, leur NPs chargées négativement ne portent aucune couronne protéique dure (forces répulsives dues aux charges négatives des PPI). Les NPs chargées positivement (cas des polyplexes CS-AN) sont quant à elles liées de façon électrostatique aux PPI, liaison beaucoup plus forte que les interactions hydrophobes (Van der Waals) observées pour les particules natives (Casals *et al.*, 2010).

Ainsi, une fois dans la circulation sanguine, les NPs doivent faire face au phénomène d'opsonisation. Il s'agit de l'élimination de particules étrangères par le système réticulo-endothélial (RES). Les macrophages du RES, typiquement les cellules de Kupffer dans le foie, ont la capacité d'éliminer les particules étrangères qui ont été préalablement recouvertes de protéines de reconnaissance, les opsonines. La catégorie des opsonines regroupe typiquement toute protéine capable d'aider à la reconnaissance des macrophages, telles que les immunoglobulines, les protéines du complément (C3, C4 et C5), les laminines et autres fibronectines. La reconnaissance des particules étrangères par les phagocytes peut se faire selon différentes voies : soit par modification structurale des opsonines (passage de la forme inactive à la forme active) qui seront reconnues par les macrophage ; soit par adhésion non spécifique des macrophages aux protéines de recouvrement ; soit par activation du complément (activation classique, alternative et via

lectine). Après reconnaissance des particules étrangères, les phagocytes vont les internaliser puis les dégrader. Cette dégradation se fait par digestion enzymatique ou encore par moyens redox (superoxydes ou peroxydes). Dans le cas où les particules phagocytées ne seraient pas biodégradables, il y aura séquestration de ces dernières au sein du macrophage ; ce qui provoquera en cas d'accumulation une toxicité aigüe (Owens & Peppas, 2006).

2.3.2.2 Déstabilisation stérique

Le plasma sanguin, pH 7.4, est également un environnement riche en électrolytes. On considère généralement que la concentration en sels y est de 150 mM et qu'elle a pour effet de provoquer l'agrégation irréversible des NPs entre elles. En effet les charges positives résiduelles des polyplexes CS-AN seront écrantées par les contre-ions, l'effet répulsif de ces charges de même signe sera alors annulé. Ce phénomène d'agrégation a pour effet de favoriser la reconnaissance par le RES, ce qui provoquera une élimination prématurée (Owens & Peppas, 2006).

2.3.2.3 Barrières anatomiques

Les NPs portant l'information génétique devront ensuite être capables de traverser les barrières anatomiques telles que les cellules épithéliales et endothéliales afin de se rendre aux cellules cibles et d'y être internaliser. Il semblerait que les petites particules ayant un diamètre autour de 50 nm diffusent plus rapidement et plus efficacement à travers la matrice extracellulaire et autres couches tissulaires que celles qui ont un diamètre supérieur à 100 nm (Ng & Pun, 2008).

2.3.2.4 Internalisation cellulaire

Les vecteurs non-viraux sont ensuite internalisés dans les cellules par endocytose. Selon le vecteur utilisé et le type de cellules transfectées, le mécanisme d'endocytose peut être différent : via récepteurs à clathrines, à cavéolines voire encore par pinocytose ((Murugan *et al.*, 2015); Figure 2.8). Bien que les polyplexes CS-AN portent une charge résiduelle positive et étant donc susceptible d'être facilement recouvertes par les protéines plasmatiques (Section 2.3.2.1); Karlsson *et al.* démontrèrent dans une étude *in vitro* que des NPs cationiques sont plus aisément internalisées que leur homologues neutres (x 2.5) ou anioniques (x 25). Néanmoins la/les voie(s) d'internalisation cellulaire de telles particules chargées positivement n'y sont pas clairement définies (Karlsson *et al.*, 1999). Une étude similaire a été conduite en 2014 par Bannunah *et al.*

dans laquelle l'endocytose par clathrine et la macropinocytose semblent être les voies privilégiées des nanoparticules cationiques de 50 à 100 nm de diamètre (Bannunah *et al.*, 2014).

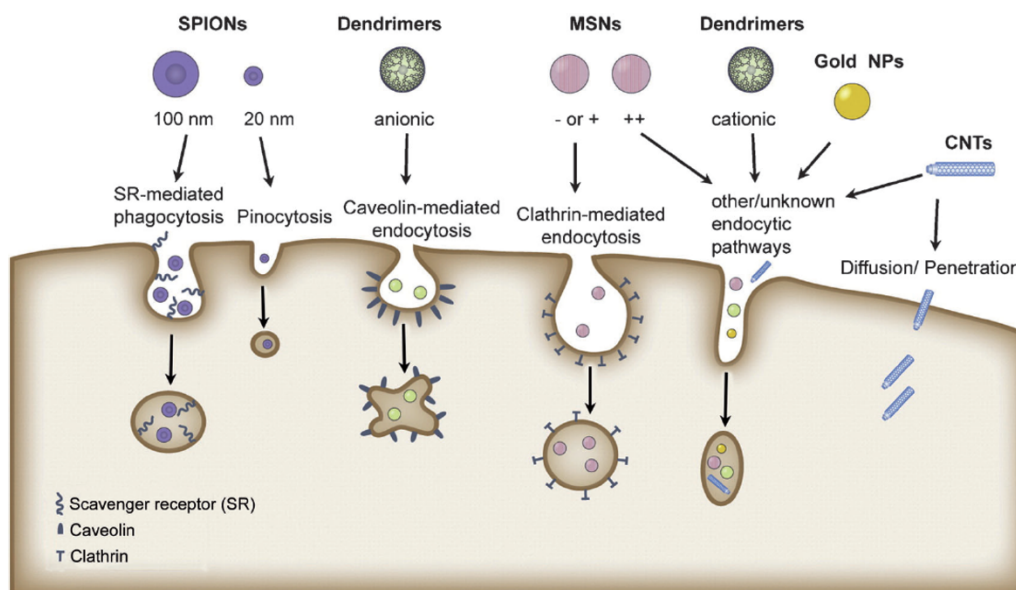


Figure 2.8 : Représentation schématique des différentes voies d'internalisation cellulaires des nanoparticules (NPs). Les chemins d'entrée varient principalement en fonction de la taille des particules, de leur charge de surface ainsi que du type de cellule transfectée (CNT= carbon nanotube; MSN= mesoporous silica nanoparticle; SPION= superparamagnetic iron oxide nanoparticle). Figure tirée de Kunzmann *et al.* (Kunzmann *et al.*, 2011).

2.3.2.5 Sortie de l'endosome

Nous avons vu dans le paragraphe 2.3.1.4 que le pouvoir tampon des polyplexes est également un facteur déterminant de l'efficacité de transfection. En effet, celui-ci va permettre aux polyplexes de sortir de l'endosome-lysosome par l'effet d'éponge à protons. Lors de l'acidification de l'endosome, les amines du CS vont pomper les protons, ce qui va en faire entrer davantage. Un flux d'ions Cl^- va également entrer pour neutraliser les charges positives, ce qui aura pour effet un phénomène osmolytique qui va rompre la membrane de l'endosome ((Nguyen, J. & Szoka, 2012); Figure 2.9).

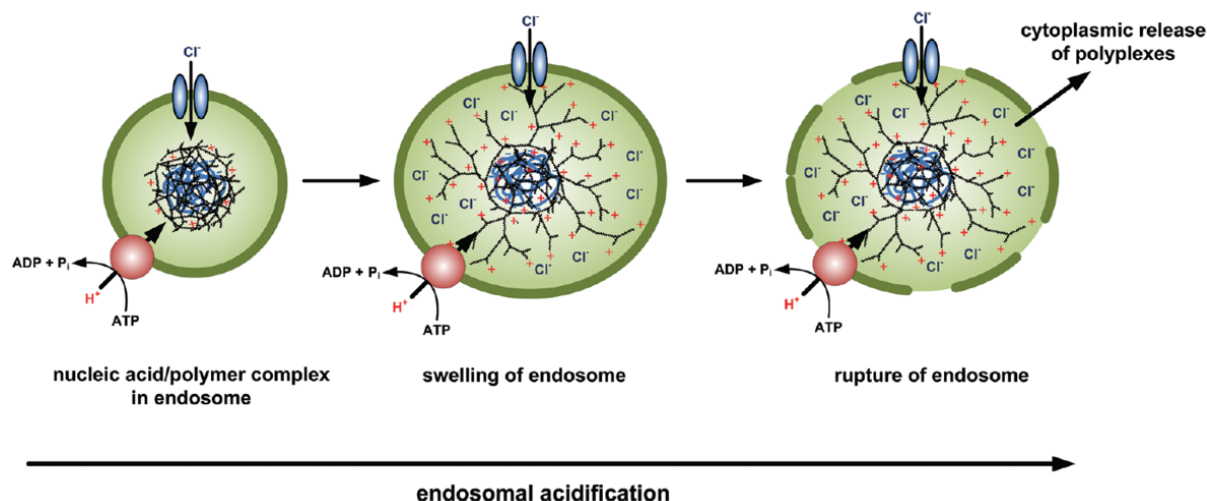


Figure 2.9 : Représentation schématique du principe d'éponge à protons. L'on y voit l'entrée des ions H^+ et Cl^- , provoquant une rupture osmolytique de la membrane de l'endosome. Figure tirée de Nguyen *et al.* (Nguyen, J. & Szoka, 2012).

Nous avons vu que le rapport $N:P_{\text{prep}}$ est de 5, mais qu'il est de 1.2-1.6 au sein des polyplexes CS-pDNA/ODN (Ma *et al.*, 2010; Niebel *et al.*, 2014). Cet excès de chitosane libre, donc de charges positives semble donc être nécessaire à une bonne efficacité de transfection (Thibault *et al.*, 2011).

2.3.2.6 Trafic intracellulaire et dissociation des polyplexes

Le transit intracellulaire des polyplexes est sujet à de nombreuses études et serait dépendant du type de vecteur utilisé (Nguyen, J. & Szoka, 2012). Néanmoins plusieurs hypothèses sont proposées :

Il semblerait qu'en restant davantage dans l'endosome, les polyplexes (et les NPs en général) aient une meilleure chance d'atteindre leur but et d'induire un effet. Les NPs séquestrées dans l'endosome seraient protégées et profiteraient du transport actif (dynéine, kinésine) le long des microtubules en direction du « microtubules organizing center » (MTOC), situé près du noyau cellulaire (Dinh *et al.*, 2007).

Le trafic intracellulaire des NPs serait a priori directement lié à leur séquestration dans les vésicules endosomales. Une étude de notre groupe concernant l'influence de la structure du CS sur le transit endosomal démontre que le passage des NPs dans l'endosome augmenterait l'efficacité de transfection (Thibault *et al.*, 2011). Une autre hypothèse serait qu'un temps de circulation prolongé

dans l'endosome autoriserait la dégradation des polyplexes, facilitant ainsi leur dissociation (Nordtveit *et al.*, 1996).

Le mécanisme exact de dissociation des polyplexes n'est pas totalement élucidé. La dissociation des complexes se ferait par compétition avec des polyanions cytoplasmiques tels que des protéines et des RNAs (Labat-Moleur *et al.*, 1996).

2.3.2.7 Le passage de la membrane nucléaire

À l'instar de la livraison de siRNA / ODNs et de mRNAs dont l'action se produit dans le cytoplasme, les pDNAs vont devoir entrer dans le noyau par passage des pores nucléaires. Ceci n'est valable que pour les cellules qui ne sont pas en réplication, phénomène dans lequel la membrane nucléaire se dissocie.

2.3.3 Avantages et Limitations des polyplexes chitosane-acides nucléiques

Dans les sections précédentes, il a été montré que la livraison d'acides nucléiques nécessite l'utilisation de vecteur afin de protéger le matériel génétique et de lui permettre de traverser les membranes biologiques. Le CS, en tant que polymère naturel et cationique, est un vecteur de choix de par sa biocompatibilité et sa faible toxicité. Lorsque mélangé à l'AN, le CS (dont les charges positives sont en excès par rapport aux charges négatives de l'AN) permet de former des nanoparticules stables appelées polyplexes. Ces polyplexes ont des tailles allant de 50 à un peu plus de 200 nm de diamètre (ce qui leur permet de transiter au travers des membranes biologiques) et portent une charge résiduelle positive (ce qui leur procure une certaine stabilité colloïdale dans l'eau, une internalisation cellulaire facilitée ainsi qu'une propension à sortir de l'endosome par l'effet d'éponge à protons).

Par contre, une fois dans des milieux physiologiques, les polyplexes perdent leurs charges du fait du pH physiologique (pH 7.4) et des hautes concentrations salines (150 mM), ce qui provoque leur agrégation irréversible. Une telle augmentation de taille des polyplexes provoque une reconnaissance accrue des protéines plasmatiques (PPI) et donc leur élimination prématurée. De plus, les charges positives sont reconnues très aisément par les protéines plasmatiques, ce qui diminue d'autant plus leur temps de circulation *in vivo* et donc ce qui diminue l'efficacité thérapeutique de telles nanostructures. Les polyplexes CS-AN sont donc des vecteurs efficaces *in vitro*, mais leur utilisation *in vivo* demande quelques améliorations. La PEGylation, qui fait l'objet

du prochain chapitre, est une solution aux limitations énoncées. En effet, cette méthode qui, dans notre cas, consiste à « couvrir » les polyplexes d'un bouclier hydrophile de poly(éthylène glycol) (PEG), permettrait d'assurer la stabilité colloïdale des particules et d'avoir un effet répulsif sur les PPIs et ainsi d'augmenter le temps de circulation dans les vaisseaux sanguins (Allen *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2007).

2.4 Poly(éthylène glycol) et nanoparticules PEGylées

Bien que les polyplexes composés d'acides nucléiques (ANs) et de chitosane (CS) soient appropriés pour des applications *in vitro*, leur utilisation *in vivo* se limite à des administrations locales du fait de leur faible stabilité colloïdale dans les conditions physiologiques et des interactions avec les composants sanguins qui vont diminuer leur temps de circulation (Kabanov, V. A. & Kabanov, 1998; Li, W. & Szoka, 2007). La stratégie la plus répandue pour remédier à cette limitation serait de greffer du poly(éthylène glycol) (PEG) sur la surface des polyplexes, modification qui, en créant un « bouclier hydratant », préviendrait leur agrégation et limiterait l'adsorption des protéines plasmatiques (PPI) réduisant ainsi leur élimination par le système réticulo-endothélial (RES) (Kamaly *et al.*, 2012).

Les PEGs sont des polymères cristallins et thermoplastiques. Ce sont des polyéthers, linéaires ou branchés, composés d'unités monomériques d'éthylène glycol (-O-CH₂-CH₂-) de 44 g.mol⁻¹. Contrairement aux autres polymères hydrophiles, le PEG est non chargé et extrêmement soluble dans une grande variété de solvants (Lee, J. H. *et al.*, 1995).

2.4.1 Propriétés physico-chimiques du PEG

2.4.1.1 Solubilité dans l'eau

À température ambiante, le PEG est le seul polymère de sa catégorie (les oxydes de polyéthylène) à être soluble dans l'eau et ce de manière quasiment infinie. Ceci est dû à la façon dont sont hydratés ses atomes d'oxygène : l'eau est un liquide très structuré de par son important réseau de liaisons hydrogènes. L'orientation de ces liaisons H, ainsi que les orbitales de l'oxygène de la molécule d'eau adoptent une géométrie tétraédrique. Kjellander et Florin ont suggéré que le PEG a la faculté de s'insérer parfaitement dans ce réseau tétraédrique, sans en perturber la géométrie (Kjellander & Florin, 1981). En effet le PEG va adopter une conformation hélicoïdale (gauche-trans-gauche) dans l'eau, conformation qui lui permet de respecter les distances imposées par les liaisons H au sein de leur réseau (Harder *et al.*, 1998).

2.4.1.2 Paramètres thermodynamiques

Le comportement du PEG en solution peut être interprété au travers de ses paramètres thermodynamiques que sont son paramètre d'interaction polymère-solvant (χ) et son « second virial coefficient » (A_2).

2.4.1.2.1 Le paramètre d'interaction « polymère-solvant » (χ).

Également appelé paramètre d'interaction de Flory-Huggins, il représente l'énergie d'interaction par mole de solvant pour un système polymère-solvant donné. Selon la théorie de Flory-Huggins, l'énergie libre de mélange ΔG_M d'un liquide avec un polymère pour former une solution est donnée par la relation suivante :

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$$

$$\Delta H_M = RT \chi n_1 v_2$$

$$\Delta S_M = -R (n_1 \ln v_1 + n_2 \ln v_2)$$

$$\text{Soit } \Delta G_M = RT (n_1 \ln v_1 + n_2 \ln v_2 + \chi n_1 v_2)$$

Avec : ΔH_M = Enthalpie de mélange

ΔS_M = Entropie de configuration de mélange

n_1, n_2 = moles de solvant, de polymère

v_1, v_2 = fractions volumiques de solvant, de polymère

On voit que si χ prend une valeur positive, le signe de ΔH_M va rester positif et ainsi le mélange ne sera pas favorisé. Par contre vu que v_1 et v_2 sont des fractions volumiques, leurs logarithmes respectifs seront toujours négatifs, donc ΔG_M restera de signe négatif.

Les valeurs expérimentales de χ pour le PEG dans l'eau varient entre 0.4 et 0.5 dépendamment de la température à laquelle ont été faites les mesures (Lee, J. H. *et al.*, 1995). Le PEG présente la valeur de χ la plus basse parmi tous les polymères hydrosolubles non chargés, ceci caractérise son important pouvoir de miscibilité à l'eau.

2.4.1.2.2 « Second virial coefficient » A_2

Il s'agit d'une caractéristique des interactions intermoléculaires entre un solvant et un polymère, ou entre polymères dans un même solvant. Un A_2 positif indique l'association entre le polymère considéré et les molécules de solvant, ou les interactions répulsives entre les molécules de polymère entre elles dans un même solvant. Pour les polymères non ioniques A_2 est positif et sa valeur est d'autant plus grande si le solvant est un bon solvant pour le polymère considéré (ce qui est le cas du PEG avec H_2O). On peut ainsi voir A_2 comme l'expression de volumes mutuellement exclus par des chaînes de molécules voisines. Avec ces valeurs de l'ordre de $30 \text{ à } 115 \times 10^4 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol} \cdot \text{g}^{-2}$ (dépendantes de la température et de la taille du PEG), le PEG va être fortement hydraté et ses chaînes vont être hautement répulsives les unes envers les autres (Lee, J. H. *et al.*, 1995).

2.4.1.3 Innocuité du PEG

Le PEG est approuvé par la « Food and Drug Administration » (FDA) en tant qu'adjuvant pour les produits agroalimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques (administrations intraveineuses, topiques, ophtalmiques, rectales et nasales)¹. En effet, le PEG montre une très faible toxicité et est éliminé totalement par les reins ($\text{PEG} < 30 \text{ kDa}$) et par le foie ($\text{PEG} > 20 \text{ kDa}$) (Yamaoka *et al.*, 1994). Le PEG seul, en tant que polymère, est non-immunogène (Zalipsky & Harris, 1997); aucune génération d'anticorps après administration clinique n'ayant, à ma connaissance, été rapportée. Néanmoins, Beyerle *et al.* ont montré que la PEGylation de PEI provoque une augmentation de la production de cytokines (par rapport au PEI seul) dans les cellules pulmonaires après 24h. Ceci voudrait dire que le PEI PEGylé induit une réponse inflammatoire, réponse qui intervient après leur reconnaissance par les récepteurs de type Toll (TLR) situés sur la membrane des lysosomes. D'après leurs données, une réponse inflammatoire serait détectée alors que le polymère seul n'engendrerait aucune cytotoxicité (Beyerle, Irmeler, *et al.*, 2010; Beyerle, Merkel, *et al.*, 2010).

2.4.2 Nanoparticules PEGylées et résistance aux protéines de reconnaissances

Plusieurs théories expliquant les facultés qu'a le PEG à limiter l'adsorption de protéines seront évoqués dans cette section, à savoir la stabilisation stérique et la mobilité de la chaîne de PEG en

¹ <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/getiigWEB.cfm> (en date du 2 octobre 2016)

solution (Figure 2.10). Le cas des NPs PEGylées sera alors abordé en soulignant l'importance de la densité de PEG en surface des particules face à l'adsorption des PPI.

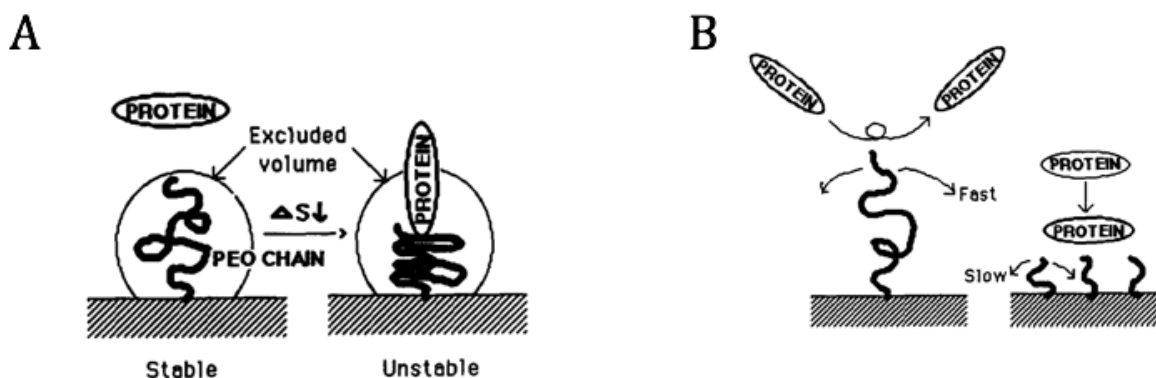


Figure 2.10 : Schématisation des mécanismes de résistances du PEG face aux phénomènes d'adhésion protéiques. A) Effet de stabilité stérique expliqué par une diminution de l'entropie ; B) Mobilité de la chaîne de PEG en fonction de sa taille. Figure inspirée de Lee et al. (Lee, J. H. *et al.*, 1995).

2.4.2.1 Effets de stabilisation stérique

L'effet de stabilisation stérique peut être divisé en deux catégories distinctes : *l'effet du volume de restriction* (stabilisation entropique) d'une part et *l'effet d'exclusion de volume* d'autre part.

Dans la *théorie du volume de restriction*, il est assumé que les deux surfaces qui s'approchent sont impénétrables (ΔH_M , l'enthalpie de mélange, sera considérée comme négligeable). La couche adsorbée est ainsi comprimée et les segments de polymères proches de cette région de contact vont perdre leur entropie de configuration (les segments en question vont donc adopter moins de configurations qu'à l'état libre). Cette réduction de ΔS_M provoque l'augmentation de ΔG_M ($\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M$), produisant un effet de répulsion entre les surfaces (Hesslink *et al.*, 1971).

Dans la *théorie d'exclusion de volume*, on considère que les surfaces s'approchant l'une de l'autre vont pouvoir se superposer. ΔH_M intervient lorsqu'il y a chevauchement des régions. En effet la concentration de segments de polymères augmente dans cet espace confiné. En parallèle on observe une baisse du nombre de configurations possibles que vont pouvoir adopter les chaînes de PEG. Ceci se traduit par une diminution de ΔS_M . Les interactions polymère - solvant seraient alors remplacées par des interactions polymère - polymère. ΔG_M deviendrait dans ce cas davantage

positif, ce qui mène inéluctablement à un phénomène de répulsion (Atha & Ingham, 1981; Kumar, V. *et al.*, 2009).

2.4.2.2 Mobilité de la chaîne

Parmi les polymères non-ioniques hydrosolubles le PEG est le plus flexible dans l'eau. Il ne porte aucun groupe encombrant susceptible d'occasionner une gêne stérique. Il existe un lien évident entre la flexibilité de la chaîne et sa mobilité en solution : plus la chaîne de PEG est longue, plus sa mobilité sera augmentée (analogie avec le fouet). Pour une adhésion irréversible sur une surface, les protéines doivent y être en contact pendant un certain laps de temps. Les chaînes de PEG montrent une importante mobilité en solution, elles vont alors prévenir la stagnation des protéines sur la surface à protéger (Lee, J. H. *et al.*, 1995).

2.4.2.3 Densité de PEGylation

Walkey *et al.* ont démontré que le phénomène d'adsorption de protéines plasmatiques en surface des NPs ainsi que la séquestration de ces mêmes particules dans les macrophages est fonction de la densité de PEG présente en surface ((Walkey & Chan, 2012); Figure 2.11).

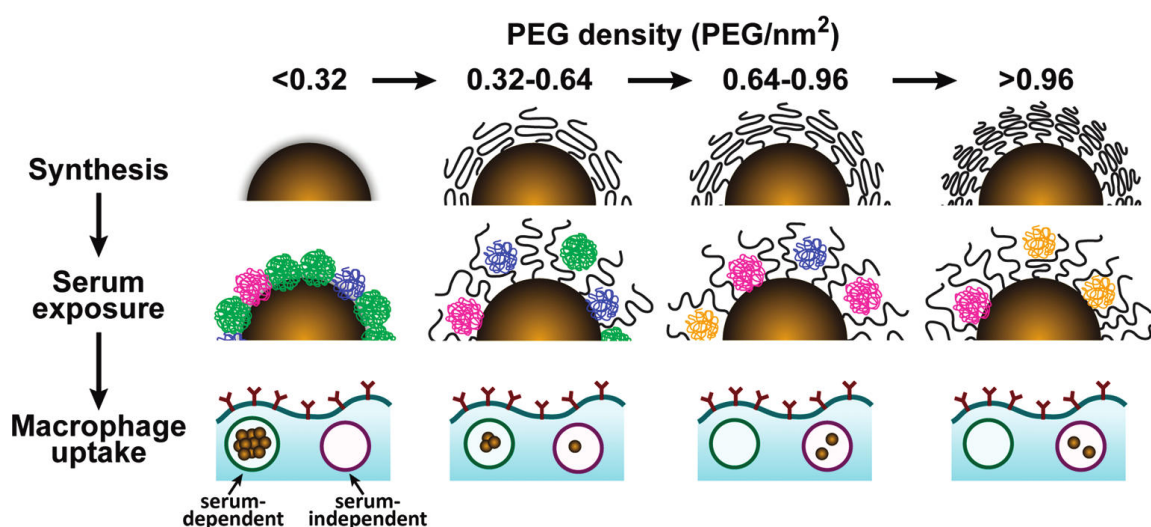


Figure 2.11 : Représentation schématique illustrant l'influence de la densité de PEG sur l'adsorption de protéines plasmatiques sur la surface de nanoparticules d'or et sur la séquestration de ces mêmes particules par les macrophages. Figure tirée de Walkey *et al.* (Walkey & Chan, 2012).

Ainsi lorsque la densité de PEG augmente, le nombre de protéines adsorbées sur les NPs diminue. On remarque aussi que le type de protéine adsorbée est influencé par le nombre de molécules de PEG en surface. Il en est de même en ce qui concerne la séquestration des NPs au sein des macrophages (en vue de leur élimination) qui est beaucoup moins efficace lorsque la concentration surfacique en PEG augmente. En effet, dans le cas des NPs non-PEGylées, voire faiblement PEGylées, la séquestration des particules dans les macrophages est dépendante du sérum, donc des protéines adsorbées en surface. Dans le cas des particules fortement PEGylées, une autre voie d'internalisation est en jeu, cette dernière est indépendante du sérum et nettement moins efficace que son homologue.

2.4.3 Nanoparticules PEGylées et stabilité colloïdale

2.4.3.1 Cas des particules non PEGylées

Le degré de stabilité colloïdale peut être défini qualitativement par le changement d'énergie résultant des différentes interactions entre particules. En effet, lorsque deux particules s'approchent l'une de l'autre sous l'effet de mouvements browniens, elles sont sujettes à deux types d'interaction : les forces statiques d'une part et les forces hydrodynamiques liées aux molécules de solvant d'autre part.

Dans la théorie DLVO (Derjaguin, Landau ; Verwey, Overbeek), la stabilité colloïdale est fonction des potentiels d'interaction électrostatique et de van der Waals (VdW), notées respectivement V_r et V_a . Le premier étant répulsif (de signe positif), le second attractif (de signe négatif) (Fendler, 1996).

$$V = V_a + V_r$$

Dans la théorie DLVO, la stabilité colloïdale provient de particules chargées dans un milieu contenant une concentration faible en électrolytes. Ce n'est pas le cas en milieu physiologique où la concentration en sels est importante. Les sels écrantent les charges positives résiduelles des NPs CS-AN ce qui réduit à néant le potentiel électrostatique répulsif. Le comportement des NPs entre elles est alors dicté uniquement par le potentiel d'interaction de VdW. Il y aura floculation irréversible des NPs.

2.4.3.2 Cas des particules PEGylées

En 1980, de Gennes évoqua l'existence de deux régimes pour les polymères attachés sur une surface dépendamment de la densité de leurs points d'attache. Si cette densité est faible, le polymère est dit en régime « champignon » ; Si par contre cette densité est élevée, le polymère est alors compressé et est ainsi forcé de s'allonger et de se mettre en régime « brosse » ((de Gennes, 1980); Figure 2.12).

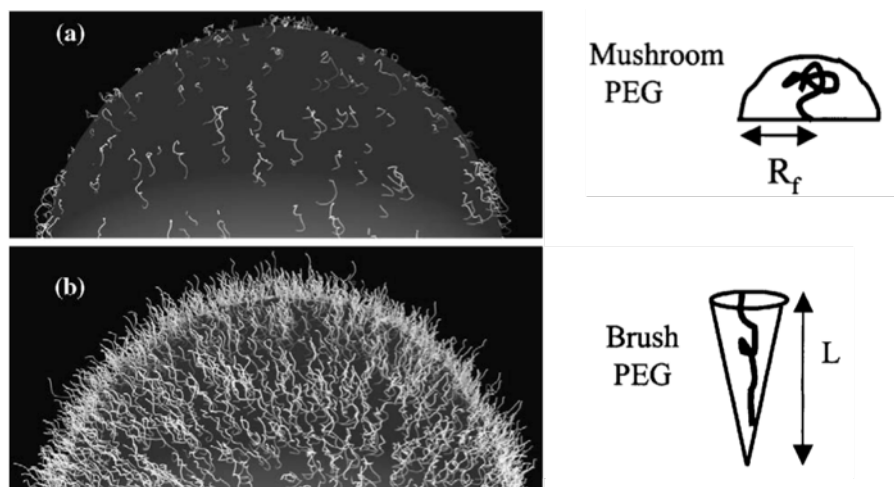


Figure 2.12. Configurations du PEG en fonction de sa densité sur une surface. (a) Le régime « champignon » où le PEG est considéré comme une demi-sphère de rayon R_f (Rayon de Flory) posée sur la surface. (b) Le régime « brosse » où le PEG est considéré comme un cône de longueur d'extension L . Figure adaptée de Harris et al. (Harris, J. M. & Chess, 2003).

$L > R_f$ indique que la couche superficielle de PEG sera plus épaisse dans le régime « brosse » que dans le régime « champignon ». Le passage d'une forme à l'autre est non seulement fonction de la densité, mais aussi de la longueur du polymère considéré. La section 2.4.2.2 traite du rôle de la mobilité de chaîne contre l'adsorption des protéines et implique une longueur de chaîne de PEG assez conséquente ($M_n \geq 2000 \text{ g.mol}^{-1}$). Le régime brosse semblerait par conséquent être le plus adéquat quant à la défense des NPs face aux phénomènes d'agglomération et d'adhésion protéique (Torchilin & Papisov, 1994).

En 1985, de Gennes proposa une approximation de la composante DLVO liée à deux surfaces planes couvertes de PEG en régime brosse (de Gennes, 1985). Cette composante répulsive (notée V_{PEG} et de signe positif) est fonction de la longueur L du PEG en régime *brush*.

$$V(h)_{NP} = V_a + V_r + V_{PEG}$$

Dans ce cas, le PEG va former une couche d'hydratation autour des NPs. Le potentiel électrostatique diminuera dans les conditions physiologiques mais le phénomène de répulsion, qui va à l'encontre des forces attractives de VdW, est maintenant assuré par le PEG. En effet, le PEG (dont les brins ne peuvent s'interpénétrer) va couvrir la distance minimale à ne pas franchir pour éviter toute agglomération irréversible des nanoparticules.

2.4.4 Innocuité des nanoparticules PEGylées

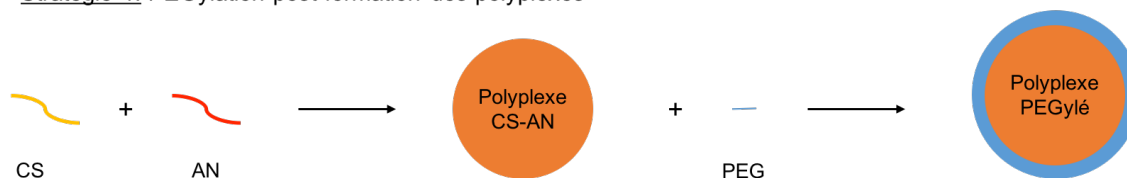
Bien qu'aucune étude n'ait rapporté une quelconque immunogénicité au PEG en tant que polymère, il a été observé que certaines formulations impliquant des particules PEGylées puissent être à l'origine de réactions immunitaires. D'une part, certaines particules PEGylées seraient susceptibles d'activer le complément et donc d'engendrer un choc anaphylactique et ce, surtout lors d'administrations fréquentes et répétées (Chanan-Khan *et al.*, 2003; Schellekens *et al.*, 2013). D'autre part, certaines activations du système immunitaire adaptatif conduisant à la synthèse et à la sécrétion d'immunoglobulines anti-PEG (sécrétions d'IgM (Ishihara *et al.*, 2009), d'IgG (Judge *et al.*, 2006) et de lymphocytes B (Ishida & Kiwada, 2013)) ont également été publiées. Ainsi, après une première sensibilisation aux NPs PEGylées, l'organisme aurait la capacité de reconnaître plus facilement ces dernières lors d'une seconde administration, provoquant l'élimination prématurée des particules de la circulation sanguine. Notons toutefois que l'effectivité et le type de réponse immune ainsi que le taux d'élimination des NPs est fonction des caractéristiques physico-chimiques des formulations et de la nature du vecteur employé, de la dose administrée et du type d'animal étudié (Saadati *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2014).

2.5 Formation des polyplexes chitosane – acide nucléique PEGylés

La PEGylation des polyplexes chitosane-acide nucléique (CS-AN) permet de contourner leur instabilité relative dans les conditions *in vivo* en leur assurant stabilité colloïdale et répulsion partielle des protéines plasmatiques. Par contre, la PEGylation a pour effet de masquer les charges positives résiduelles des polyplexes CS-NA et de limiter leur internalisation cellulaire. C'est ce qu'on appelle le « PEG dilemma » (Itaka, Keiji & Kataoka, 2009). Néanmoins, cet inconvénient est dépassé par une disponibilité supérieure de telles nanoparticules (NPs) pour leur cible thérapeutique, *via* l'augmentation de la demi-vie des polyplexes dans le flux sanguin ainsi que par la possibilité de cibler les particules *via* de l'adressage actif en utilisant des ligand spécifiques (Kim, H. J. *et al.*, 2016).

Dans le cas du CS en tant que vecteur, deux principales stratégies de PEGylation ont été recensées dans la littérature : 1) L'ajout de poly(éthylène glycol) (PEG) en surface des polyplexes préformés ; 2) L'utilisation de copolymères chitosane-PEG (en greffon ou en bloc, notés respectivement CS-g-PEG et CS-b-PEG) pour la formation de polyplexes avec de l'acide nucléique (Figure 2.13).

Stratégie 1: PEGylation post-formation des polyplexes



Stratégie 2: Utilisation de copolymères CS-PEG pour la formation de nanoparticules

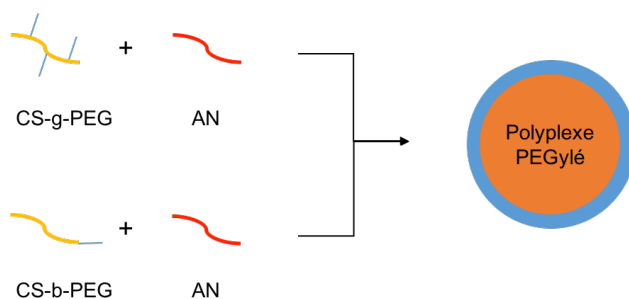


Figure 2.13 : Représentation schématique des 2 stratégies de PEGylation recensées dans la littérature ; La stratégie 1 représente la PEGylation des polyplexes chitosane-acide nucléique (CS-

AN) après leur formation, alors que la stratégie 2 fait intervenir des copolymères en greffon (CS-g-PEG) ou en bloc (CS-b-PEG) lors de la formation de polyplexes PEGylés avec l'acide nucléique (AN).

2.5.1 PEGylation de surface

Leong *et al.* proposèrent le greffage de PEG en surface de polyplexes chitosane-ADN plasmidique (CS-pDNA) préformés. En effet, un α -malemidyl- ω -*N*-hydroxysuccinimidyl poly(éthylène glycol) (NHS-PEG-MAL) a été greffé sur les amines du CS résiduel par formation d'une liaison amide via un carbodiimide comme agent de couplage. Vu que le PEG est greffé après la formation du polyplexe, il ne risque pas de perturber la complexation du CS à l'AN comme cela pourrait être le cas de la formation de NPs via copolymères à greffon (Leong *et al.*, 1998). Les limitations de cette approche seraient principalement le manque d'uniformisation des NPs ainsi formées et la difficulté de les caractériser avec précision. En effet, du fait que la densité de PEGylation est un critère déterminant quant à l'efficacité de protection des NPs *in vivo*, il est indispensable de s'assurer qu'un nombre suffisant de chaînes de PEG est disponible en surface afin d'être en configuration « brosse ».

2.5.2 Copolymères à greffons

La formation de copolymères à greffons, CS-g-PEG, s'effectue par greffage latéral du PEG sur la chaîne de CS, par fonctionnalisation des amines en C2 et de l'hydroxyle en C6 (Figure 2.14).

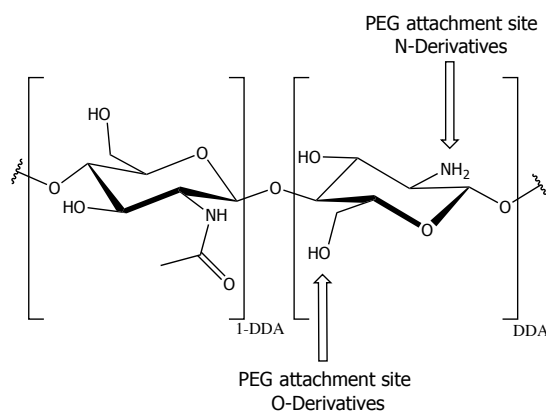


Figure 2.14. Représentation schématique des sites possibles de greffage de PEG sur la chaîne latérale du CS, formant des copolymères à greffon, CS-g-PEG. Notons que la position C6 des unités acétylées peut être également occupée par le PEG.

2.5.2.1 N-greffe

En 1984, Harris *et al.* ont été les premiers à effectuer la synthèse d'un copolymère CS-g-PEG en utilisant une réaction de couplage entre les amines primaires du chitosane et un PEG-aldéhyde (Harris, J. Milton *et al.*, 1984). Néanmoins, cette méthode fut limitée par l'instabilité de la fonction aldéhyde (hydratation, oxydation). Cet inconvénient a été surmonté plus tard par la formation *in situ* de l'aldéhyde par hydrolyse d'un PEG dialdéhyde diéthylacétal (Bentley *et al.*, 1998) qui va se greffer par amination réductrice sur l'amine en C2 du CS. De nos jours, la méthode la plus utilisée pour la formation de CS-g-PEG, passe par la synthèse de dérivés PEG N-hydroxy succinimidyl ester (PEG-NHS) en solution aqueuse, utilisant le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) comme agent de couplage. Cette chimie, largement répandue dans la fonctionnalisation de macromolécules biologiques, permet la formation d'une liaison amide stable et ce à de hauts rendements (Shen *et al.*, 2009).

Bien que la chimie de greffage de PEG sur les amines du CS soit aisée, cette modification apporte certaines limitations quant à leur emploi pour la livraison d'AN : Premièrement, ce sont les amines du chitosane qui portent les charges positives nécessaires à la formation de polyplexes via complexation avec les ANs. Le fait d'occuper ces amines par du PEG diminue alors le nombre d'interactions électrostatiques potentielles et par conséquent affecte la stabilité des nanoparticules. Deuxièmement notons que la distribution de PEG se fait de façon aléatoire le long de la chaîne de CS, dépendamment de la répartition des groupements acétylés (donc de l'origine du CS). On retrouve ainsi le problème d'uniformisation des CS-g-PEG, limitation susceptible de porter atteinte à une bonne répétabilité des résultats. Cette méthode, bien que couramment employée, est alors difficilement adaptable aux exigences pharmaceutiques (Casettari *et al.*, 2012).

2.5.2.2 O-greffe

Même si le greffage N-greffe du chitosane reste la méthode la plus répandue, certaines études ont proposé la copolymérisation via les groupements hydroxyles des résidus glucosamine. Cette technique de greffage a l'avantage de laisser les amines disponibles pour faire des interactions électrostatiques avec l'AN.

Néanmoins, les amines étant des espèces nucléophiles plus réactives que les alcools, une protection préalable des amines du chitosane est obligatoire. La protection des amines, généralement effectuée par phthaloylation, augmente la solubilité du CS dans les solvants organiques (Nishimura *et al.*,

1991). Par contre, leur déprotection en plus de n'être pas totalement efficace (présence de 20% de groupes phthaloyles résiduels après déprotection) (Lebouc *et al.*, 2005), introduit des éléments difficiles à purifier (Oxyde d'argent ou hydrazine, respectivement Ag_2O ou $\text{NH}_2\text{-NH}_2$) susceptibles d'endommager les chaînes de chitosane (Gorochovceva & Makuška, 2004; Hu, Y. *et al.*, 2005).

Enfin, comme pour la N-greffe, la O-greffe est un greffage latéral de PEG sur le CS. Les mêmes problèmes potentiels de stabilité des nanoparticules évoqués avec les N-greffons sont susceptibles d'être rencontrés.

2.5.3 Copolymères en blocs

Face aux limitations posées par les techniques de greffage latéral du PEG au chitosane (CS-g-PEG), la synthèse d'un copolymère à blocs CS-b-PEG est proposée via le greffage du PEG sur l'extrémité terminale réductrice du CS. Ainsi la synthèse d'un CS-b-PEG ne fait pas intervenir les amines et autres groupements hydroxyles latéraux du CS ; et une fois chargées, les amines restent donc disponibles pour interagir avec les ANs lors de la condensation du copolymère en polyplexes. Le PEG ne pouvant se greffer que sur l'extrémité réductrice du CS, son degré de substitution sera toujours constant. Cette régiosélectivité permettrait ainsi l'uniformité des structures copolymériques et assurerait de ce fait une répétabilité et reproductibilité des résultats.

Ce type de copolymère semble plus adapté à la formation de NPs et ce de manière répétable. Nous verrons dans le paragraphe 2.5.4.2 que la formation de copolymères en blocs à partir d'une unité polyionique (CS) et d'une autre unité neutre (PEG) formerait un type particulier de complexes polyélectrolytes ayant des propriétés micellaires, appelés « Bloc Ionomer Complexes » (BIC). L'utilisation de CS-b-PEG formant de telles structures permettrait au PEG de s'exprimer plus facilement à la surface des polyplexes, procurant ainsi la protection recherchée (stabilité colloïdale et diminution de l'adsorption protéique) (Kabanov, A. V. *et al.*, 1996).

Deux approches de formation de CS-b-PEG similaires seront présentées ; la première faisant intervenir le mannose terminal formé post-dépolymérisation à l'acide nitreux, la seconde faisant intervenir l'ouverture de cycle du dernier monomère réducteur lors de son équilibre de mutarotation.

2.5.3.1 Mannose terminal

Dans le paragraphe 2.2.2.2 nous avons vu que la dépolymérisation du CS par l'acide nitreux (HONO) est une méthode rapide et parfaitement contrôlée produisant des tailles de CS désirées. En effet, les amines du CS attaquent l'acide nitreux et la liaison glycosidique adjacente est rompue lors de réarrangements (Figure 2.15). Une mole de HONO est consommée par mole d'amines et une unité 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) est formée au niveau de l'extrémité terminale du brin qui vient d'être coupé (Allan & Peyron, 1995a, 1995b). Comme présenté ci-après, un groupement aldéhyde (électrophile) est alors disponible pour des réactions avec des espèces nucléophiles telles que les amines et les thiols.

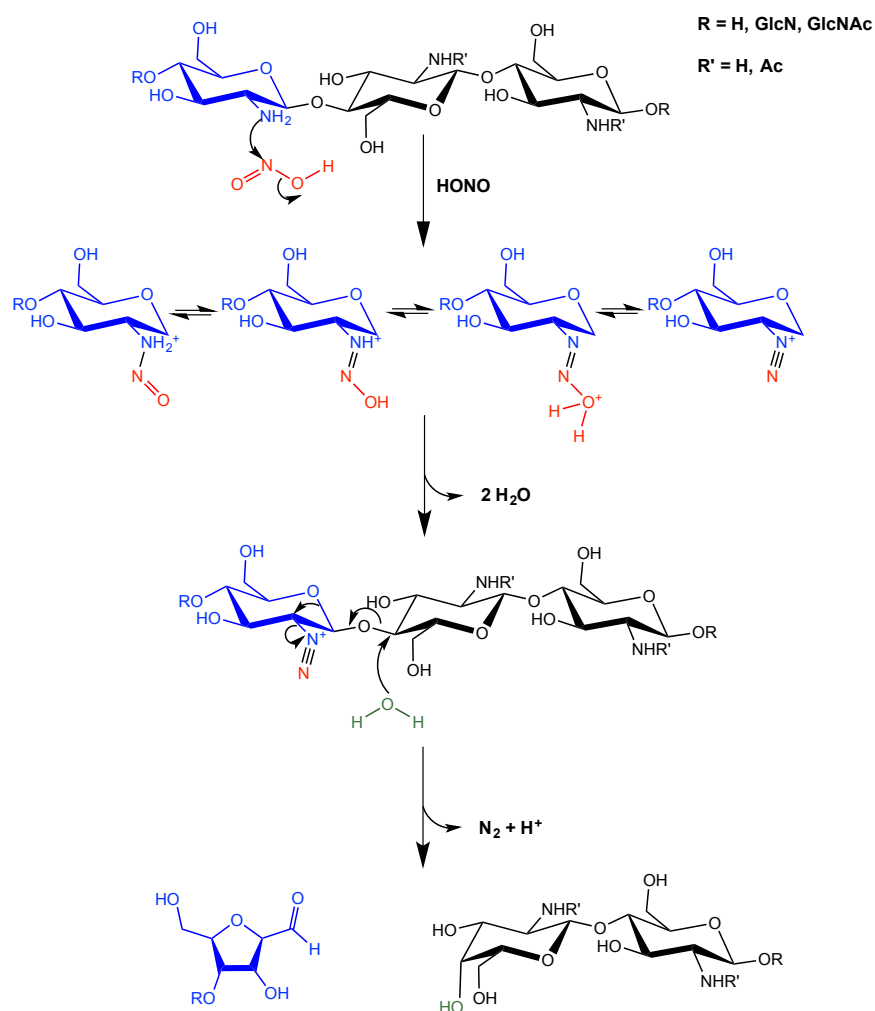


Figure 2.15 : Mécanisme proposé de dépolymérisation du chitosane par l'acide nitreux (HONO) menant à la coupure de la chaîne de chitosane initiale et à la formation d'une unité terminale 2,5-

anhydro-D-mannose (M-Unit) sur l'un des deux brins formés (GlcN = glucosamine ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Ac = acétyle).

Le pKa des amines du CS variant de 5.5-6.5 (Filion *et al.*, 2007) ; elles deviendront à pH > 7 de forts nucléophiles qui sont susceptibles de réagir sur l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit en formant une base de Schiff (imine). Cette réaction est réversible et se déroule par condensation (dégagement d'une molécule d'eau) (Figure 2.16). En retirant l'eau, on déplace donc l'équilibre en faveur de la formation de la base de Schiff. Cette réaction a été réalisée pour créer des CS branchés par Tømmeraas *et al.* en 2002 et en 2011. Des trimères « GlcNAc-GlcNAc-M-Unit » ont été couplés à une longue chaîne de CS desacétylée. Cette réaction a été réalisée par amination réductrice *via* la formation de bases de Schiff entre les amines de la chaîne et les aldéhydes de la M-Unit des trimères, suivis de la réduction de ces liaisons formée pour les rendre irréversible (Tømmeraas, K. *et al.*, 2002; Tømmeraas, K *et al.*, 2011). La même approche a été reprise par Morimoto *et al.* en utilisant des CS branchés de plus grande taille, sur lesquels ils greffent à nouveau du CS branché et ce toujours par amination réductrice (Morimoto *et al.*, 2011).

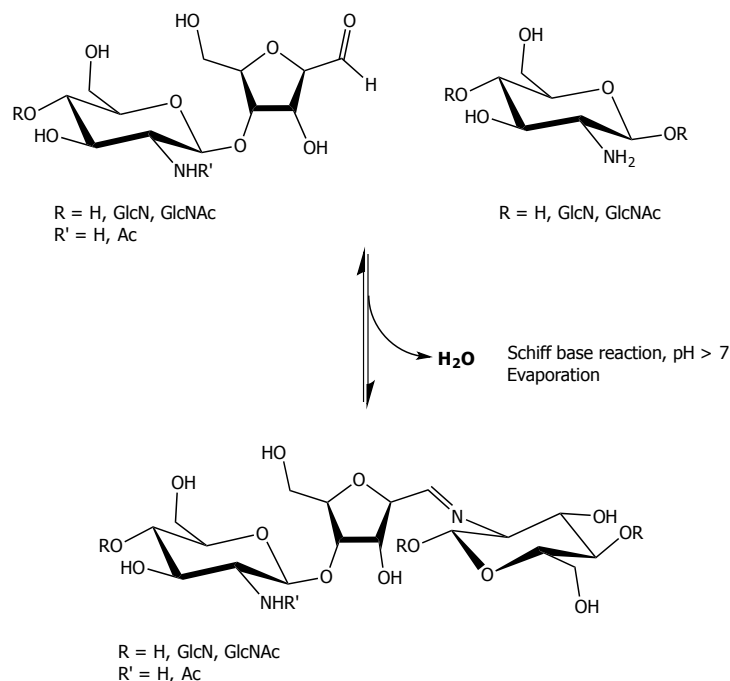


Figure 2.16 : Représentation schématique de la formation d'une base de Schiff par condensation de l'aldéhyde porté par le mannose terminal d'un brin de chitosane (CS) et d'une fonction amine

déprotonnée d'un second brin de CS (GlcN = glucosamine ; GlcNAc = N-acétylglucosamine ; Ac = acétyle).

Azevedo *et al.* ont quant à eux formé des gels « réversibles » de CS sans ajout de stabilisant (hydrures) comme c'est l'usage habituellement. Ainsi, les amines du CS ont réagi sur les aldéhydes terminaux de brins de CS adjacents via formation de bases de Schiff (Azevedo *et al.*, 2012). Tripathi *et al.* ont modifié l'extrémité réductrice du CS avec du PEI. Par contre aucune information sur la chimie employée n'est disponible et aucune caractérisation du copolymère n'a été rapportée (Tripathi *et al.*, 2012). Les NPs obtenues observent la même taille que les polyplexes à base de CS seul, le potentiel Zeta des particules obtenues avec du CS-b-PEI quant à lui n'augmente pas de façon significative (par rapport aux particules faites de PEI) afin de confirmer une telle modification.

En 2002, Liu *et al.* ont modifié des billes de verre en les habillant avec du CS. Les billes de verre ont été préalablement recouvertes par des cystéines, « linkers » dont les groupements thiol et amine primaire vont s'accrocher par cyclisation intramoléculaire sur l'aldéhyde du mannose terminal du CS via la formation d'une thiazolidine (Liu, X. D. *et al.*, 2003). Mais l'efficacité de cette transformation demeure très faible (Fonctionnalisation < 1%), certainement du fait des répulsions électrostatiques entre les chaînes de CS et l'amine de la cystéine à conjuguer, ainsi que de par la perte d'unités réactives (M-Unit) suite aux transformations du CS.

L'instabilité du mannose terminal a néanmoins été étudiée par Tømmeraas *et al.* en 2001. Ils ont démontré qu'après un processus de lyophilisation, processus accompagné de formation d'imines entre les brins de CS (déshydratation et concentration des espèces présentes), la solubilisation du CS lyophilisé en milieu aqueux et acide (pH<4) provoque le clivage de la M-Unit pour former de l'hydroxyméthylfurfural (HMF) (Tømmeraas, K *et al.*, 2001). Après cette étape, il n'y aura donc plus d'aldéhyde directement disponible pour une réaction de PEGylation. L'unité de laquelle le HMF a été clivé récupère néanmoins son caractère réducteur, son carbone anomérique (C1) n'étant engagé dans aucune liaison glycosidique.

2.5.3.2 Ouverture de cycle

La dernière solution évoquée ici pour parvenir à la conjugaison régiosélective entre le PEG et le chitosane est la conjugaison par ouverture de cycle (ROP). Cette technique est rendue possible par l'existence de différentes formes tautomères du glucosamine en solution, comme c'est le cas pour

les autres sucres. Ces différentes formes peuvent passer de l'une à l'autre par le phénomène de mutarotation, qui fait passer, par ouverture de cycle, un sucre de sa forme α à sa forme β (Figure 2.17). Cette ouverture n'est possible que pour les sucres réducteurs, c'est-à-dire que seuls les sucres qui auront leur carbone anomérique libre (non engagé dans une liaison) pourront subir l'équilibre de mutarotation (Isbell, 1967).

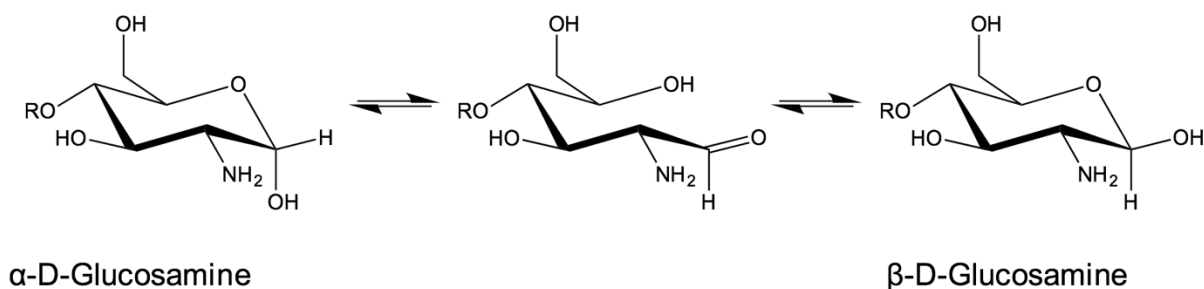


Figure 2.17 : Représentation schématique de l'équilibre de mutarotation du glucosamine entre ses anomères α et β , passant par la forme ouverte qui présente une fonction aldéhyde. Par souci de clarté, uniquement la forme pyranose du glucosamine est représentée.

Toutefois, de nombreuses études montrent que pour tous les sucres, la fraction de forme acyclique en solution est très faible par rapport aux formes cycliques. Au-delà de cette considération ; la fraction hydratée de l'aldéhyde dans l'eau (gem-diol) est plus importante que la fraction d'aldéhyde en solution. Ainsi, d'après Maple *et al.* une solution de D-glucose à 37°C à pH 4.8 contient uniquement 0.0024% de forme aldéhyde (Maple & Allerhand, 1987). Les valeurs disponibles pour d'autres sucres sont également du même ordre de grandeur (Drew *et al.*, 1998). Le taux d'interconversion du glucosamine dans l'eau a été étudié par Skelley *et al.* en 2006, sa valeur serait fonction du pH. En effet, il varie de 0.72 ± 0.09 à $2.2 \pm 0.3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ en augmentant le pH de 9 à 10. Cela signifierait qu'à pH acide, conditions de solubilisation du CS, ce taux serait plus faible et l'aldéhyde serait donc encore moins présent (Skelley & Mathies, 2006). D'un point de vue pratique, les temps de réaction nécessaires pour atteindre des rendements convenables avec de telles réactions de copolymérisation seraient de plusieurs jours voire des semaines, et ce à des concentrations élevées (Schatz & Lecommandoux, 2010).

Une alternative à la ROP serait de convertir l'extrémité réductrice des polysaccharides en lactone, lactames ou autres esters cycliques ; modification qui rendrait le site de liaison plus disponible et

donc plus réactif que l'aldéhyde acyclique (Schatz & Lecommandoux, 2010). Cette alternative rendrait en revanche le chitosane sensible à des réactions secondaires intra- et intermoléculaires entre les groupements amines et l'ester cyclique en bout de chaîne (Zhang, T. & Marchant, 1994).

La PEGylation par ouverture de cycle du monomère réducteur a été pratiquée pour la première fois par NEKTAR THERAPEUTICS, une firme de biotechnologies spécialisée dans les procédés de PEGylation destinés à l'industrie pharmaceutique. Ils font intervenir un PEG oxyamine qui va se lier sur l'aldéhyde terminal du CS via « oxime-click » à des fins de livraison de siRNA (McManus, 2012).

Novoa-Carballal *et al.* évoquent dans leur étude la possibilité de greffage d'un PEG oxyamine sur le mannose terminal du CS, sans y procéder. Il y est également question d'autres polysaccharides comme le dextran et l'acide hyaluronique. Un de leurs essais a été réalisé sur une unité glucosamine, sans faire intervenir l'aldéhyde du mannose mais davantage l'ouverture du cycle de glucosamine. Cet article reste néanmoins la copie conforme de la chimie utilisée par NEKTAR THERAPEUTICS et les copolymères « formés » manquent de caractérisation permettant d'affirmer que le greffage a eu lieu (Novoa-Carballal & Muller, 2012).

Benediktsdottir *et al.* proposèrent également la liaison d'un fluorophore sur l'extrémité terminale réductrice du CS, toujours par oxime-click (Benediktsdottir *et al.*, 2012).

2.5.4 Polyplexes formés à partir de copolymères CS-PEG

Après avoir traité les chimies disponibles pour la formation de copolymères CS-PEG, intéressons-nous aux nanoparticules formées à partir de ces ensembles (CS-g-PEG et CS-b-PEG) lors de leur complexation avec deux types d'acides nucléiques : l'ADN plasmidique (pDNA; long, circulaire et double-brin) vs. l'ARN interférent (siRNA; court, rectiligne et double-brin). L'emphasis sera particulièrement mise sur la formation de structures interpolyelectrolytes ayant un comportement micellaire, les « block-ionomer complexes » (BICs).

2.5.4.1 Polyplexes PEGylés via CS-g-PEG

2.5.4.1.1 ADN plasmidique (pDNA)

Bien que le PEG soit susceptible d'encombrer stériquement les charges positives du CS, aucune difficulté de compaction du CS-g-PEG avec les pDNAs n'a été rapportée (Jiang, X. *et al.*, 2006;

Lin *et al.*, 2011). Les NPs formées offrent une bonne stabilité dans le plasma sanguin avec une bonne protection face aux dégradations enzymatiques (Park *et al.*, 2001). De tels polyplexes montrent une efficacité de transfection supérieure *in vivo* comparé aux NPs formées de CS-pDNA, voire de PEI-pDNA (Jiang, X. *et al.*, 2006). Plus récemment il a été démontré que l'introduction d'une composante hydrophobe (acide hexanoïque) sur le CS-PEG permettrait de moduler la dissociation de tels polyplexes PEGylés et ainsi d'augmenter davantage l'efficacité de transfection (Layek *et al.*, 2014).

2.5.4.1.2 ARN interférent (siRNA)

Par contre comme évoqué dans la section 2.3.1.3 pour la stabilité des polyplexes CS-siRNA, les NPs de CS-g-PEG condensés aux siRNAs n'offrent pas la même stabilité que leurs analogues pDNAs. Les siRNAs étant nettement plus petits et rigides que les pDNAs, en plus du PEG qui masque partiellement les charges du CS, leur qualité de compaction ne peut qu'en être affectée (Gary *et al.*, 2007). Ceci explique pourquoi la grande majorité de la littérature consacrée au devenir de telles NPs fait intervenir des hétéro-copolymères tels que le CS-g-(PEI-b-mPEG) (Duan *et al.*, 2008), le PLR-PEG-g-CS (à base de poly-L-Arginine) (Noh *et al.*, 2010). Dans ces deux exemples, les études *in vitro* montrent une meilleure protection et des taux de transfection supérieurs qu'avec leurs contrôles respectifs. Dans le but de palier à la faible stabilité de telles particules, une autre stratégie a été développée mettant en jeu une réticulation par interactions électrostatiques de la NP via un folate (Li, T. S. C. *et al.*, 2014).

2.5.4.2 Polyplexes PEGylés via CS-b-PEG

En 1995, Kabanov *et al.* proposèrent une stratégie alternative consistant au développement de nanoparticules neutres et solubles adoptant un comportement micellaire. Ces NPs sont formées de l'association d'AN et de copolymères à blocs composés de polycations et de PEG (Kabanov, A. V. & Kabanov, 1995). Kabanov glissa le terme « Block Ionomer Complexes » (BIC; (Kabanov, A. V. *et al.*, 1996) pour décrire ce nouveau type de complexes polyélectrolytes micellaires qui s'assemble selon des interaction électrostatiques. Il se forme ainsi un cœur hydrophobe composé de polyanions neutralisés entouré d'une couronne de segments neutres (Figure 2.18; (Pergushov *et al.*, 2012)).

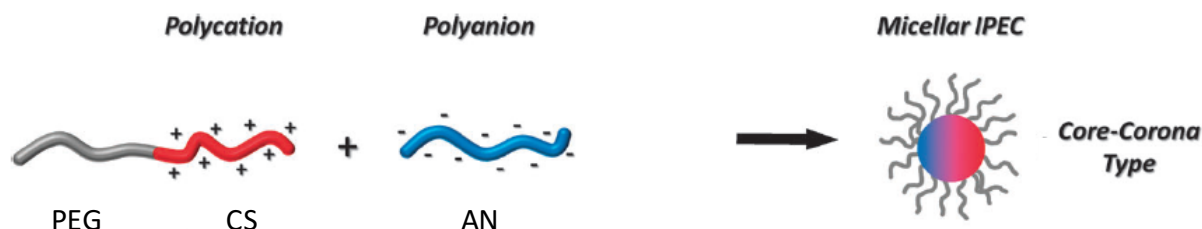


Figure 2.18 : Représentation schématique de la structure attendue de “Block Ionomer Complex” via la complexation entre bloc copolymère CS-b-PEG et acides nucléiques sous un aspect micellaire (Cœur hydrophobe couronné de PEG, appelé ici IPEC pour « Interpolyelectrolyte complex »). Figure adaptée de Pergushov *et al.* 2012 (Pergushov *et al.*, 2012).

2.5.4.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

Les BICs observent d’une manière générale une morphologie plus uniforme (généralement sphérique) et des distributions de tailles plus petites (taille inférieure) que leurs homologues formés uniquement de polyélectrolytes (Harada & Kataoka, 1995; Cohen Stuart *et al.*, 2005; Matsumoto *et al.*, 2009; Voets *et al.*, 2009).

Plusieurs paramètres contrôlent les propriétés et la stabilité de telles structures: la **longueur des blocs** ainsi que la **densité de charge linéaire** des polyélectrolytes : le PEG doit avoir une certaine longueur pour assurer la micellisation et une bonne stabilisation stérique en conditions physiologiques (Kabanov, V. A. & Kabanov, 1998). De plus Harada *et al.* déterminèrent que pour assurer une bonne stabilité du cœur des BICs la longueur des segments polyélectrolytes devrait correspondre, donc la longueur du polycation devrait en théorie être similaire à celle du polyanion (Harada & Kataoka, 1999); le **pH**, même si les BICs sont moins sensibles au pH que leurs homologues polyélectrolytes (Kabanov, A. V. *et al.*, 1996) ; le **rapport N:P de préparation**, il va être différent du rapport N:P de préparation des complexes CS-AN. En effet, mélanger CS et AN avec un rapport N:P=1 provoquera leur floculation irréversible; alors que pour les BICs, un tel rapport sera assumé par stabilité colloïdale due au PEG qui pointe en surface (Pergushov *et al.*, 2012).

Comme les complexes non-PEGylés, les BICs sont sensibles aux milieux riches en **sels** ; D’une part à cause de leur nature électrostatique et d’autre part, leur caractère micellaire va dépendre de leur **concentration micellaire critique** (CMC ; concentration au-dessus de laquelle les micelles se

forment), qui elle-même dépend de la force ionique du milieu (Kabanov, V. A. & Kabanov, 1998; Matsumoto *et al.*, 2009). Dans le cas de micelles classiques à base de surfactants, l'ajout de sel (augmentation de la force ionique) dans le milieu masque les charges du tensioactif ionique et la micellisation survient plus tôt (diminution de la CMC). En effet, les forces motrices d'assemblage sont dans ce cas les interactions hydrophobes et la force qui s'oppose à la formation de micelles classiques serait électrostatique, donc dépendante de la concentration ionique du milieu de formation (Larpernt, 1995). Dans le cas des BICs, quand la concentration en sels augmente, la CMC augmente car les forces motrices d'assemblage sont électrostatiques et donc sensibles à la force ionique du milieu. Le processus de micellisation s'arrêterait dans ce cas en fonction de la concentration en copolymère PEGylé. En effet, en augmentant la proportion chaînes de PEG au sein de la couronne hydrophile, il y aura répulsion stérique des brins de PEG entre eux et donc une diminution du nombre de leurs configurations possibles (les brins de PEG n'étant pas interpénétrants). Ce phénomène est alors traduit par une diminution de l'entropie de configuration du PEG, l'ajout supplémentaire de copolymère PEGylé pour la formation de la NP sera donc défavorable (Voets *et al.*, 2009).

Un autre paramètre à déterminer pour les BICs est la **force ionique critique**. Il s'agit de la concentration ionique au-dessus de laquelle les BICs ne se formeront plus et surtout la concentration à atteindre pour rompre l'association de ces complexes. Dans la littérature, les concentrations salines critiques des BICs varient de 50–600 mM (Voets *et al.*, 2009). Les variations de concentrations critiques dépendent évidemment des différents polycations et acides nucléiques (siRNA vs. pDNA) à se condenser (Kabanov, V. A. & Kabanov, 1998). Outre son effet sur la formation des micelles, la force ionique influence la dynamique de ces structures. Avant d'atteindre la concentration saline critique, plus la force ionique est importante, plus les échanges intermoléculaires sont favorisés, ce qui permettra des réarrangements internes au complexe considéré (Bakeev *et al.*, 1992).

Ainsi les BICs sont des **systèmes dynamiques** qui, plutôt que d'être des structures cinétiquement gelées tels que les liposomes cationiques (dont les tailles et formes dépendent davantage des conditions de préparation; (Cohen Stuart *et al.*, 2005)), répondront à leur environnement tels que les phénomènes de substitution et autres réactions d'addition; phénomènes reconnus pour être responsables de la libération intracellulaire d'acides nucléiques (Voets *et al.*, 2009).

2.5.4.2.2 *pDNA* vs. *siRNA*

D'une manière générale, les BICs transportant des pDNAs sont colloïdalement stables en milieu physiologique, moins toxiques et peuvent se dissocier en milieu intracellulaire pour libérer l'AN. Néanmoins leur entrée dans la cellule ainsi que leur sortie de l'endosome se trouvent parfois limitées à cause de la couronne de PEG entourant les BICs (cf. PEG dilemma). L'internalisation serait alors facilitée par l'augmentation de la demi-vie des NPs (donc en augmentant la présentation des NPs aux cellules considérées) et par l'addition de ligands tels que le lactose ou la transferrine (Voets *et al.*, 2009; Hatakeyama *et al.*, 2011) ; alors que la sortie de l'endosome serait facilitée en introduisant un lien labile (un pont disulfure, lien sensible aux conditions réductrices de l'endosome) entre le polymère cationique et le PEG (Harada-Shiba *et al.*, 2002; Takae *et al.*, 2008).

Des études de transfections avec des BICs (PEG-b-PLL) transportant des pDNAs ont montré des résultats de transfection comparables à la lipofectamine avec une cytotoxicité moindre ; résultats encourageants lorsqu'on sait que les BICs présenteront une meilleure protection dans les vaisseaux sanguins (Harada-Shiba *et al.*, 2002; Itaka, K. *et al.*, 2003).

Il est possible que la stabilité observée dans le cas du transport de pDNA ne soit pas suffisante pour les siRNAs ; différence due à la structure des siRNAs (petits et rigides). En effet, des BICs formés de PEG-b-PLL/siRNA sont dissociés en conditions physiologiques, sous l'effet de la forte concentration en sels. Ce problème de stabilisation du cœur micellaire de cette structure avec les siRNAs a été résolu par une réticulation du cœur via des ponts disulfures. Cette réticulation, offrant une stabilisation extracellulaire et une dissociation intracellulaire, montra une efficacité nettement supérieure par rapport aux BICs non réticulés (Matsumoto *et al.*, 2009). Une autre solution possible pour remédier aux problèmes posés par la structure des siRNAs engagés dans de tels complexes serait de lier les siRNAs entre eux par des ponts disulfures. Ces poly-siRNAs auraient alors une souplesse comparable aux pDNAs et donc une qualité de compaction similaire. Mais arrivés dans l'endosome, la dissociation des BICs serait nettement plus aisée du fait de la déstabilisation du système sous les conditions endosomales réductrices (Lee, S. J. *et al.*, 2012).

CHAPITRE 3 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT

Le contexte de ce projet de recherche a été exposé dans le chapitre précédent (Chapitre 2), brièvement : Les formulations de polyplexes chitosane-acide nucléique (CS-AN) de première génération, obtenues par interactions électrostatiques entre le CS et l'AN, présentent beaucoup d'avantages en conditions *in vitro* (stabilité colloïdale, internalisation cellulaire et sortie de l'endosome facilitées par les amines du CS, caractère non-cytotoxique). Néanmoins, après leur administration *in vivo*, ces polyplexes subissent des phénomènes d'agrégation (dû à l'absence de charges répulsives) et d'adsorption de protéines plasmatiques (PPI), provoquant ainsi leur élimination prématurée de l'organisme par le système réticuloendothélial. La PEGylation des polyplexes, qui consiste en l'addition de poly(éthylène glycol) (PEG) dans les formulations de nanoparticules, permettrait de contourner les limitations susmentionnées. Le PEG formerait alors une couche protectrice (bouclier hydratant) autour des polyplexes, leur assurant stabilité colloïdale et répulsion partielle des PPI, prolongeant ainsi leur demi-vie au sein de l'organisme.

Parmi les stratégies de PEGylation existantes, notre choix s'est porté sur la formation de structures interpolyélectrolytes ayant un comportement micellaire, les « block ionomer complexes » (BICs). Les BICs seraient formés par auto-assemblage via la complexation d'ANs et de copolymère en bloc CS-b-PEG, le cœur des particules devenant ainsi hydrophobe entouré d'une couche protectrice de PEG hydrophile. Une telle structure à base de CS n'a pas encore été proposée dans la littérature et permettrait d'ouvrir de nouvelles voies au CS en tant que système de livraison. Ainsi l'objectif principal de ce projet de Doctorat est de former un copolymère en blocs CS-b-PEG et de l'engager dans la formation de BICs.

Afin d'entreprendre une telle démarche, il est nécessaire de **1)** d'identifier et de caractériser précisément le point d'encrage du PEG en bout de chaîne du CS; **2)** de déterminer la chimie de conjugaison adéquate pour synthétiser le copolymère en blocs CS-b-PEG, respectant la régiosélectivité de la transformation en écartant toute réaction secondaire potentielle; **3)** d'engager le copolymère avec de l'AN dans la formation de polyplexes et d'attester de leur structure micellaire. Tout ce processus est décrit en détails à travers une publication scientifique qui fera l'objet du prochain chapitre, à savoir le Chapitre 4.

Chapitre 4 : Regioselective Thioacetylation of Chitosan End-Groups for Nanoparticle Gene Delivery Systems

Ce chapitre correspond à la première publication issue de ce projet de Doctorat, publiée dans *Chemical Science* en 2015 (Pickenhahn *et al.*, 2015). Les objectifs de cette étude sont représentés ci-dessous dans la Figure 3.1, issue de la publication mentionnée ci-dessus.

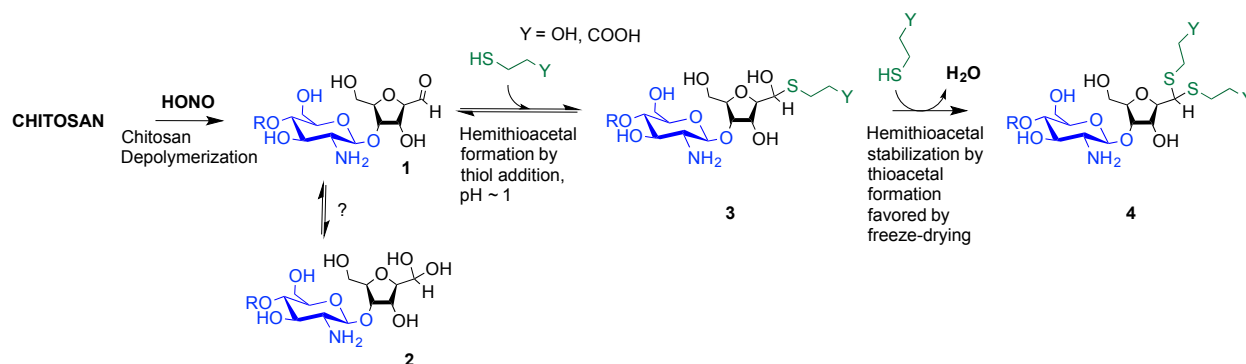


Figure 3.1 : Représentation schématique du développement du procédé de thioacétylation en bout de chaîne du CS (Pickenhahn *et al.*, 2015). Le premier objectif de cette étude est de déterminer la disponibilité de la forme réactive de l'aldéhyde terminal du CS, porté par le 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) (1), ce dernier étant en équilibre avec sa forme hydratée et non-réactive (2). Bien que dans l'eau, cet équilibre semblerait être déplacé vers la forme hydratée de l'aldéhyde, dite *gem*-diol, une chimie de conjugaison efficace sur cet aldéhyde serait toutefois possible par catalyse acide en conditions aqueuses. Le second objectif de ce projet est l'étude de la réactivité de l'aldéhyde terminal du CS envers les thiols. Le mécanisme proposé ferait intervenir une première attaque de thiol (ex : β -mercaptoethanol et acide 3-mercaptopropionique, BME and MPA respectivement) sur l'aldéhyde de la M-Unit formant l'intermédiaire hémithioacétal (3) au travers d'un équilibre pH-dépendent. Par analogie avec la formation d'imines dans laquelle l'équilibre est déplacé lorsqu'on retire l'eau, l'hémithioacétal serait lui stabilisé en thioacétal par lyophilisation (4).

Bien que lors de son équilibre de mutarotation, le dernier monomère réducteur du CS offre une fonction aldéhyde par ouverture de cycle, la façon la plus aisée de générer des extrémités réactives de CS est de procéder à sa dépolymérisation à l'acide nitreux (HONO), produisant ainsi une unité 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit), portant également une fonction aldéhyde (Figure 3.1 – structure 1). La première partie de ce chapitre fut dédiée à l'évaluation de la disponibilité de cette fonction aldéhyde, cette dernière étant également présente sous sa forme hydratée et non-réactive, dite *gem*-diol (Figure 3.1 – structure 2).

Des études similaires de conjugaison en bout de chaîne du CS ont été menées en utilisant la chimie click-oxime, mais leur succès demeure relatif car aucune caractérisation précise des conjugués n'est disponible. En tant qu'approche alternative, la thioacétylation de l'aldéhyde terminal du CS par catalyse acide en condition aqueuse fut ensuite étudiée à l'aide de molécules portant une fonction thiol. La réactivité des thiols face aux carbonyles étant supérieure à celle de leurs homologues amines ou hydroxyles, une telle chimie permettrait d'épargner toute réaction secondaire indésirable et d'assurer la régiosélectivité de la transformation. Bien que l'aldéhyde terminal du CS porté par la M-Unit soit principalement sous sa forme hydratée et donc non-réactive, sa forme réactive serait en équilibre avec l'hémithioacétal correspondant sous l'addition d'un thiol (Figure 3.1 – structure 3). Une seconde attaque nucléophile d'un thiol permettrait alors de stabiliser l'intermédiaire hémithioacétal en thioacétal. Ainsi deux attaques de thiol successives accompagnées de la libération d'une molécule d'eau seraient nécessaires à l'obtention d'une structure stable; stabilisation facilitée par lyophilisation (Figure 3.1 – structure 4).

En tant qu'application directe de cette nouvelle chimie de conjugaison, la PEGylation en bout de chaîne du CS sera effectuée par thioacétylation, produisant un copolymère en blocs noté CS-b-PEG₂. Ce dernier sera alors engagé avec de l'ADN plasmidique pour former des polyplexes ayant une structure micellaire, les BICs.

La thioacétylation de l'aldéhyde terminal du CS proposée dans le Chapitre 4, porte néanmoins certaines limitations. Ces dernières seront évoquées dans une seconde publication qui fait l'objet du Chapitre 5, dans lequel sera détaillé une approche beaucoup plus polyvalente que celle-ci; l'approche dite du Triskelion.

Chapitre 5: Regioselective Chitosan End-Group Activation: The Triskelion Approach

Ce chapitre correspond à la seconde publication issue de ce projet de Doctorat, soumise à *Chemical Science* en 2016 (Pickenhahn *et al.*, 2016)

Comme évoqué précédemment, le procédé initial de modification d'extrémité terminale du CS par thioacétylation nécessite deux attaques nucléophiles successives afin d'obtenir une structure stable : le thioacétal. L'efficacité de cette réaction de conjugaison est toutefois limitée lorsque de grosses structures, telles que du PEG-thiol, sont engagées avec l'aldéhyde terminal du CS. Ainsi l'encombrement stérique occasionné par la présence de la première chaîne de PEG au niveau de l'hémithioacétal diminuerait les chances de réaction d'une seconde chaîne de PEG au même endroit. Une autre limitation à cette approche serait qu'elle s'effectue à pH très acide, condition qui serait susceptible de porter atteinte à l'intégrité des molécules à conjuguer en bout de chaîne du CS. Ces inconvénients seront contournés à l'aide d'une nouvelle approche impliquant l'activation préalable de l'extrémité terminale du CS avec un linker trivalent : le Triskelion. Cette nouvelle approche, représentée dans la Figure 3.2, sera détaillée au sein de ce chapitre.

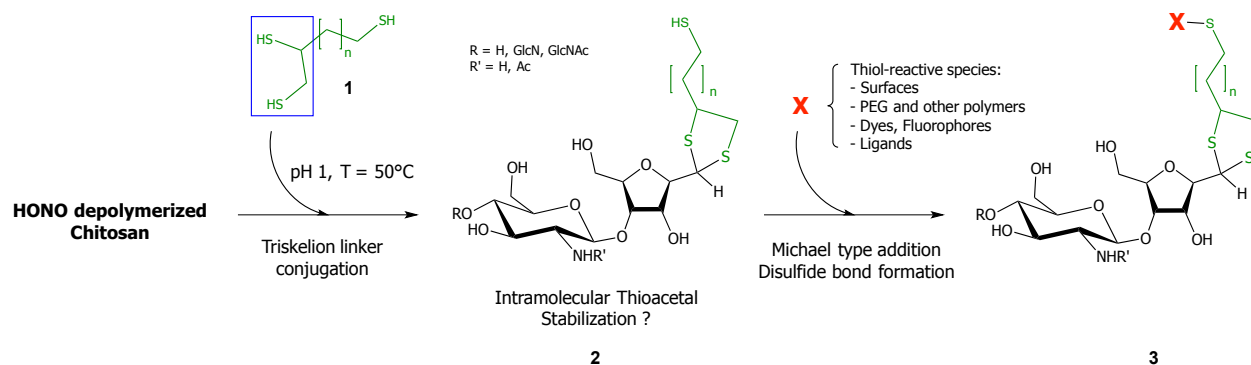


Figure 3.2 : Représentation schématique du développement de l'activation régiosélective de l'extrémité terminale du CS par thioacétylation par un linker trivalent (1) nommé Triskelion (Pickenhahn *et al.*, 2016). Ce dernier comprend un crochet-thiol (encadré) et une extrémité thiol située au bout d'un espaceur. La dérivation de l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit par le Triskelion devrait principalement former le thioacétal (2) en promouvant l'attaque du crochet-thiol via un mécanisme de thioacétylation intramoléculaire. Ce procédé serait plus efficace que la stratégie intermoléculaire évoquée dans le Chapitre 4, les deux attaques successives de thiols nécessaires à la stabilisation en thioacétal se faisant alors simultanément. Une fois le CS activé par le Triskelion (formation du CS-b-Triskelion), son extrémité thiol restante serait capable de réagir librement par déplacement de pont disulfure ou encore par addition de Michael (3).

Le Triskelion est un linker trivalent, portant 3 groupements thiols à chacune de ses extrémités (Figure 3.2 – structure 1). Deux d’entre eux correspondent à un crochet-thiol qui sera conjugué à l’aldéhyde de la M-Unit par thioacétylation intramoléculaire, mécanisme permettant de reproduire en une seule étape les deux attaques nucléophiles successives nécessaires à l’obtention du thioacétal (Figure 3.2 – structure 2). La troisième extrémité thiol du Triskelion qui est portée par un espaceur, sera conjuguée *a posteriori* à d’autres entités portant des fonctions réactives aux thiols, et ce dans des conditions moins agressives. Ainsi le CS sera activé sous la forme du CS-b-Triskelion qui pourra être engagé ultérieurement avec des surfaces, des polymères et autres ligands via déplacement de pont disulfure ou addition de Michael (Figure 3.2 – structure 3).

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : REGIOSELECTIVE THIOACETYLATION OF CHITOSAN END-GROUPS FOR NANOPARTICLE GENE DELIVERY SYSTEMS

Pickenhahn, V. D., Darras, V., Dziopa, F., Biniecki, K., De Crescenzo, G., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2015). Regioselective thioacetylation of chitosan end-groups for nanoparticle gene delivery systems. *Chemical Science*, 6, 4650–4664. <http://doi.org/10.1039/C5SC00038F>

4.1 Abstract

Chitosan (CS) end-group chemistry is a conjugation strategy that has been minimally exploited in the literature to date. Although the open-chain form of the CS reducing extremity bears a reactive aldehyde moiety, the most common method to generate a reactive end-group on CS is nitrous acid depolymerization, which produces a 2,5-anhydro-*D*-mannose unit (M-Unit) bearing also an aldehyde moiety. However, the availability of the latter might be low, since previous literature suggests that its hydrated and non-reactive form, namely the gem-diol form, is predominant in acidic aqueous conditions. Oxime-click chemistry has been used to react on such aldehydes with various degrees of success, but the use of a co-solvent and additional chemical reagents remain necessary to obtain the desired and stable covalent linkage. In this study, we have assessed the availability of the aldehyde reactive form on chitosan treated with nitrous acid. We have also assessed its reactivity towards thiol-bearing molecules in acidic conditions where CS amino groups are fully protonated and thus unreactive towards aldehyde. LC-MS and NMR spectroscopy methods (^1H and DOSY, respectively) confirmed the regioselective thioacetylation of the reactive aldehyde with conversion rates between 55 and 70% depending on the thiol molecule engaged. The stabilization of the hemithioacetal intermediates into the corresponding thioacetals was also found to be facilitated upon freeze-drying of the reaction medium. The PEGylation of the CS M-Unit aldehyde by thioacetylation was also performed as a direct application of the proposed conjugation approach. CS-b-PEG₂ block copolymers were successfully synthesized and were used to prepare block ionomer complexes with plasmid DNA, as revealed by their spherical morphology vs. the rod-like/globular/toroidal morphology observed for polyplexes prepared using native unmodified

chitosan. This novel aqueous thiol-based conjugation strategy constitutes an alternative to the oxime-click pathway; it could be applicable to other polymers.

4.2 Introduction

Chitosan (CS), a linear and cationic polysaccharide composed of D-glucosamine (GlcNH₂) and N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) units, is derived from chitin by deacetylation. This non-toxic polyelectrolyte holds great interest due to its biocompatibility, biodegradability and mucoadhesive properties (Rinaudo, 2006). Chitosan and its derivatives have been proposed for applications including gene and drug delivery, tissue repair, water purification and cosmetics (Sashiwa & Aiba, 2004; Aranaz *et al.*, 2010; Casettari *et al.*, 2012; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012; Buschmann *et al.*, 2013). Two general approaches have been explored to chemically modify CS: lateral “graft” and “block” modifications. The former involves conjugation to CS lateral functional groups (amine or hydroxyl) whereas the latter relies on conjugation to CS end-groups.

Several strategies for grafting onto CS amines (N-2-graft) have been proposed in the literature. For example, PEG and other graft-copolymers have been proposed to enhance CS solubility at physiological pH and increase the colloidal stability of CS-based polyelectrolyte complexes (Park *et al.*, 2001; Germershaus *et al.*, 2008), while ligands for specific cell targeting (Zhang, C. *et al.*, 2004; You *et al.*, 2007) or fluorescent dyes (Na *et al.*, 2011) have also been grafted onto CS amines. However, lateral grafting can potentially compromise the ability of CS to bind nucleic acid and thus limit the stability and efficiency of chitosan/nucleic acid polyelectrolyte complexes for gene delivery applications. Indeed, lateral grafting can impede the ability of CS to electrostatically bind to negatively charged species by reducing its effective charge density and by potentially creating steric hindrance with bulky moieties (Casettari *et al.*, 2012). Alternatively, the O-6 grafting approach has been proposed to overcome the charge density reduction issue, although grafting of a bulky moiety at this position is likely to create steric hindrance and hence limit complexation with oppositely charged polymers or molecules as well. Additionally, O-6 grafting is technically challenging as it necessitates protection–deprotection steps for the CS amine moieties (Lebouc *et al.*, 2005).

To overcome these limitations, CS block conjugation strategies (e.g., branched CS (Tømmeraas, K. *et al.*, 2002; Morimoto *et al.*, 2011), PEGylation (McManus, 2012), CS-PEI block- copolymer formation (Tripathi *et al.*, 2012), CS labeling (Benediktsdottir *et al.*, 2012), etc.) have recently been proposed as a means to modify the CS properties without compromising its ability to bind oppositely charged macro-ions such as nucleic acids. Two different CS attachment sites have been

explored to date: the first is formed after CS depolymerization by nitrous acid (HONO) where a 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) is formed at the reducing end of the cleaved polymer (Figure 4.1, reaction 1), while the second site is available on the open-chain form, present in trace amounts, of the CS reducing extremity (either GlcNH₂ or GlcNAc units) and allows mutarotation between the alpha and beta anomers. These coupling strategies thus rely on the reaction of the aldehyde moiety with nucleophilic species. However, in both cases, the aldehyde moiety appears to be mostly present in its hydrated and unreactive form (Figure 4.1, reaction 2), also referred to as the *geminal*- or *gem*-diol form, under acidic aqueous conditions (Los *et al.*, 1956; Tømmeraas, K *et al.*, 2001; Azevedo *et al.*, 2012).

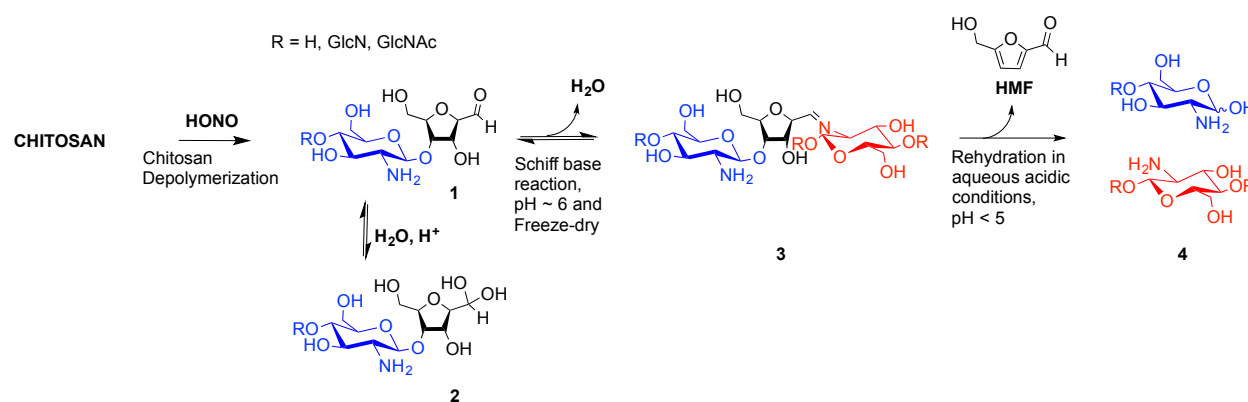


Figure 4.1 : Production of 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) at the reducing end of chitosan by depolymerization in nitrous acid (HONO): chitosan depolymerization with nitrous acid (HONO) is a rapid, well-understood, and easily controlled method for producing chitosan harbouring a 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) at the reducing end of the cleaved polymer (Allan & Peyron, 1995a). A free aldehyde group (electrophile) is then potentially accessible (1) for reaction with nucleophilic moieties (e.g., CS amine groups, thiols, oxyamines, etc.). Tømmeraas *et al.* (Tømmeraas, K *et al.*, 2001) demonstrated that the M-Unit aldehyde also exists in its *gem*-diol hydrated form (2). The neutralization of CS and subsequent freeze-drying of the depolymerization medium induces a Schiff base formation between CS neutralized amines that react with the CS M-Unit aldehyde (3). The rehydration of the imino-adducts in acidic aqueous conditions cleaves the imino linkage between CS chains, transforming the M-Unit into hydroxymethylfurfural (HMF) (4).

The amines of CS in their neutral form are strong nucleophiles that can react with the aldehyde of CS's reducing end (Figure 4.1, reaction 3). Therefore block conjugation to the CS end-group requires that the proportion of CS amines in their reactive form be minimized, for example by performing reactions at pH significantly lower than the chitosan pK_a, typically near 6.5. However,

chitosan pKa varies with both ionic strength and CS charge density and can reach values as low as about 5.5 at high charge density and in the absence of added salt (Filion *et al.*, 2007). To date, all CS end-group conjugation reactions that have been implemented rely on oxime-click chemistry (Benediktsdottir *et al.*, 2012; McManus, 2012; Novoa-Carballal & Muller, 2012; Novoa-Carballal *et al.*, 2014). The oxyamine moieties involved in these studies have a pKa value around 5 (Eloranta *et al.*, 1990) and are therefore only slightly more reactive than CS amines in acidic aqueous conditions. Additionally, although the carbon-nitrogen double bond resulting from oxime-click chemistry is more hydrolytically stable than standard imino linkages (Kalia & Raines, 2008), a conjugate stabilization by an external chemical reagent (e.g., hydrides) is necessary to stabilize the structure (Zatsepin *et al.*, 2002). Moreover, it appears that CS conjugations with such chemistry usually require a polar aprotic co-solvent addition such as acetonitrile, DMF or DMSO to improve the reaction efficiency (Shao & Tam, 1995).

The only slightly higher reactivity of oxyamine moieties towards CS aldehyde as compared to CS amines, along with the necessity of an external chemical treatment to stabilize the products and the requirement of an organic co-solvent addition, constitute limitations of the oxime-click pathway. These limitations could be overcome by a thiol-based chemistry. Indeed, thiol moieties are highly reactive towards double bonds as well as towards carbonyl groups in aqueous conditions at pH values as low as 1 where CS amines are present only in the ionized and non-reactive form (Lienhard & Jencks, 1966). Moreover, many equilibrium measurements have demonstrated the ability of thiols to add to the carbonyl group more efficiently than other nucleophiles (e.g., hydroxyls or amines) in both acid- and base-catalyzed pathways (Sander & Jencks, 1968). Whereas amines produce Schiff base compounds (Figure 4.1, reaction 3), thiols react with either aldehydes or ketones to produce hemithioacetals through a double equilibrium (Figure 4.2). It is worth mentioning that the reactive species is the dehydrated carbonyl compound so that dehydration and hemithioacetal formation represent the rate-limiting steps of this pH-dependent process (Schubert, 1936; Lienhard & Jencks, 1966).

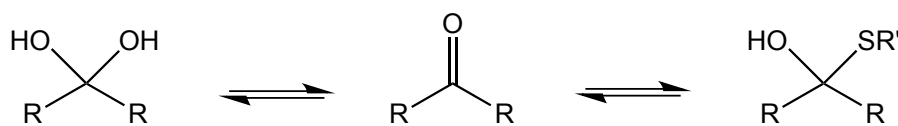


Figure 4.2 : Schematic representation of the equilibria involved in thiol-carbonyl additions.

Indeed, acid-catalyzed hemithioacetal formation takes place optimally below pH 3 (Lienhard & Jencks, 1966) and the final product is unstable under alkaline conditions, since the attack of hydroxide ions readily reverts the product to the starting reactants (Barnett & Jencks, 1967; Caraballo *et al.*, 2010).

By analogy with Schiff base formation where amines and carbonyls react to give an imino linkage (Figure 4.1, reaction 3) that needs to be stabilized by reduction, hemithioacetals can be stabilized by thioacetal formation via a second thiol nucleophilic attack (intra- or inter-molecular) associated with the release of water (Campaigne, 1961). This chemical process is widely used in organic synthesis as a carbonyl group protection strategy; it is more conveniently performed in anhydrous organic solvent (Wuts & Greene, 2006). To the best of our knowledge, such a strategy has not been implemented yet in aqueous conditions for polymer derivatization.

The main objectives of the present study were to determine which form of the aldehyde predominates on the CS end-group (i.e. hydrated *vs.* dehydrated form for a CS depolymerized using HONO) and to assess its reactivity towards thiol moieties in aqueous conditions. NMR spectroscopy experiments were performed in order to assess the availability of the CS aldehyde end-group after HONO depolymerization, since this issue has not been clearly addressed. The mechanism of stabilization of hemithioacetals by conversion to their corresponding thioacetals was also investigated by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of the products of the reaction between mannose and two small thiol-bearing molecules, namely 3-mercaptopropionic acid (MPA) and β -mercaptoethanol (BME). This process was then examined by reacting MPA and BME with a CS bearing an M-Unit end in aqueous conditions. The conjugation efficiency was determined by a combination of NMR and Ellman assays. Finally, the PEGylation of the CS M-Unit aldehyde by thioacetylation was examined as a direct application of this conjugation strategy. Figure 4.3 summarizes the objectives and the hypotheses of our study. Of interest, although the unreactive hydrated gem-diol M-Unit aldehyde moieties are predominant in acidic aqueous conditions, the thiol species react preferentially with this M-Unit versus CS amines post-HONO depolymerization, therefore avoiding the M-Unit cleavage after rehydration of the freeze-dried product. The conjugation between the M-Unit and thiol species is followed by stabilization of the hemithioacetal intermediate into the corresponding thioacetal by a second thiol

nucleophilic attack. By analogy with the Schiff base formation, freeze-drying can thus be implemented to favour the present reaction by water removal.

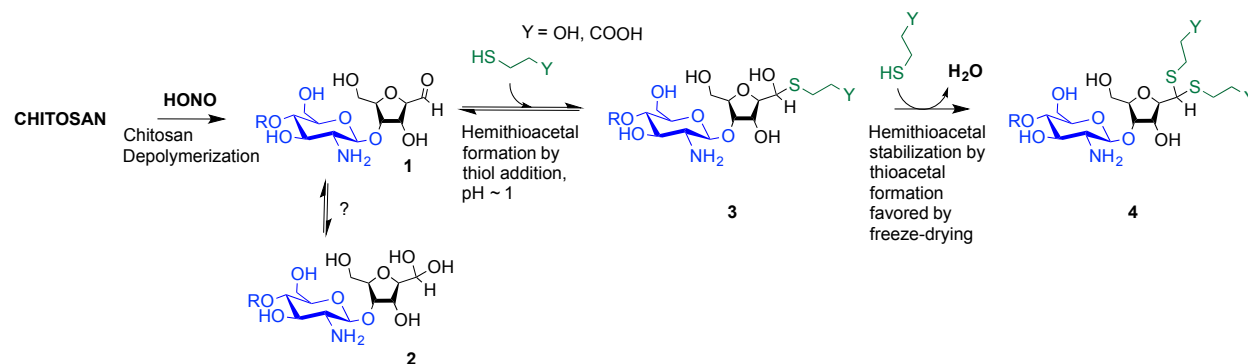


Figure 4.3 : Thioacetal conjugation to the chitosan M-Unit formed post-HONO depolymerization: the first objective of this study was to assess the availability of the reactive form of the unhydrated M-Unit aldehyde (2). Although there could be a strong displacement of the equilibrium towards the unreactive aldehyde-hydrated or *gem*-diol form in water, we hypothesized that efficient nucleophilic conjugation to the M-Unit was possible in acidic aqueous conditions. The second objective was to assess the M-Unit reactivity towards thiol moieties in aqueous conditions. The proposed reaction pathways between CS end-groups and thiols include the M-Unit CS aldehyde reacting directly with a thiol-bearing model molecule (β -mercaptoethanol and 3-mercaptopropionic acid, BME and MPA respectively) to form a hemithioacetal intermediate (3) through a pH-dependent equilibrium. By analogy with Schiff base formation where the equilibrium displacement occurs by water removal, the hemithioacetal can be stabilized into the corresponding thioacetal (4) by freeze-drying.

4.3 Materials and Methods

Each chemical reaction was performed on at least three independent occasions ($N = 3$), in Ar degassed ddH₂O and fresh reactants to minimize disulfide bond formation.

4.3.1 Reagents, materials

Chitosan with a degree of deacetylation (DDA) of 91.7%, $M_n = 193 \text{ kg.mol}^{-1}$ (PDI = 1.256) and 99.5%, $M_n = 0.8 \text{ kg.mol}^{-1}$ (PDI = 1.245) was provided by Marinard Biotech Inc. Deuterium oxide (Cat #151882), deuterium chloride 35 wt% in deuterium oxide (Cat #543047), sodium nitrite (Cat #431605), hydrochloric acid standard solution 1.0 M in H₂O (Cat #31894-9), hydrochloric acid 37% (Cat #320331), sodium hydroxide solution 1.0 M (Cat #319511), sodium acetate (Cat #241245), DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) (Cat #D8130), GlcNH₂ D-(+)-glucosamine hydrochloride 99% (Cat #C-1276), MPA (3-mercaptopropionic acid) $\geq 99\%$ (Cat #63768), BME (β -mercaptoethanol) (Cat #M6250), sodium acetate trihydrate BioXtra (Cat #S7670), Dowex® 50WX8-100 [H⁺] (Cat #217506), Dowex® 1X8-50 [Cl⁻] (Cat #217417) and sodium azide (Cat #S2002) were purchased from Sigma-Aldrich. UltraPure™ TRIS (Cat #15504-020), glacial acetic acid (Cat #351271-212) and Spectra/Por®6 dialysis membrane (MWCO = 1000 Da, Cat #132640) were purchased from Life Technologies, Fisher Scientific and Spectrum Labs respectively. mPEG-SH 2 kDa and the plasmid DNA (pDNA) pEGFP_{Luc} were purchased from JenKem Technology USA and from Clontech Laboratories, respectively.

4.3.2 Aldehyde availability

Chitosan depolymerization using deuterated species for direct ¹H NMR measurements (Allan & Peyron, 1995a).

The depolymerization reaction was performed in deuterated solvent for direct M-Unit CS aldehyde detection by ¹H NMR spectroscopy without further processing post-reaction. Chitosan with 92% DDA and $M_n = 200 \text{ kg.mol}^{-1}$ (CS 92-200) was depolymerized using nitrous acid in deuterated solvent to achieve a specific number-average molar mass (M_n) target of 1 kg.mol^{-1} (CS 92-1). These short CS chains were used to facilitate the detection and the quantification of aldehyde end-groups. Chitosan (202.5 mg) was dissolved in 37.9 mL D₂O and 170 mL of DCl 35% (w/w) at 50°C. Then 2.435 mL of fresh sodium nitrite solution (10 mg.mL^{-1} in D₂O) was added to the

dissolved CS to reach 0.5% (w/v) chitosan concentration. These conditions correspond to a GlcNH₂: HONO molar ratio of 3. The mixture was stirred for 3 h at 50°C. The pD (pD = pH + 0.4) (Lumry *et al.*, 1951) of the depolymerization medium was *ca.* 1.9 at the end of the reaction.

(Annexe B, Figure 7.3): ¹H NMR (500 MHz, D₂O/DCI, 25°C, ns=2000, d1=6s, acquisition time=2s) δ 2.06 (s, 1.38H, NHAc), 3.13-3.19 (br, 4.5H, H2D), 3.49-3.51 (br, 1H, H2A), 3.73-3.95 (m, 27H, H3-H6), 4.12-4.13 (q, J=5.1Hz, 1H, H5M), 4.22 (t, J=3.9 Hz, 1H, H4M), 4.44 (t, J=3.9 Hz, 1H, H3M), 4.58 (br, 0.5H, H1A), 4.79-4.88 (m, 4.5H, H1D), 5.09 (d, J=5.3Hz, 0.98H, H1M *Gem*-diol).

SEC-MALLS : Mn = 823 (± 41) g.mol⁻¹ ; Mw = 1024 (± 28) g.mol⁻¹ ; PDI = 1.245 (± 0.027)

4.3.3 Thiol reactivity towards M-Unit CS aldehyde

4.3.3.1 Mechanistic evaluation of chitosan thioacetylation by mass spectrometry (Figure 4.4-A).

The CS terminal end-group (2,5-anhydro-D-mannose) formed after HONO depolymerization was derivatized with thiol-bearing model molecules (BME and MPA). Since the expected products have similar structures, their sensitivity to ionization should be equivalent. These derivatized M-Unit products were analyzed in a semi-quantitative way by comparing the chromatogram integration peaks of specific m/z values corresponding to both proton ([M + H]⁺) and sodium ([M + Na]⁺) adducts within the same run.

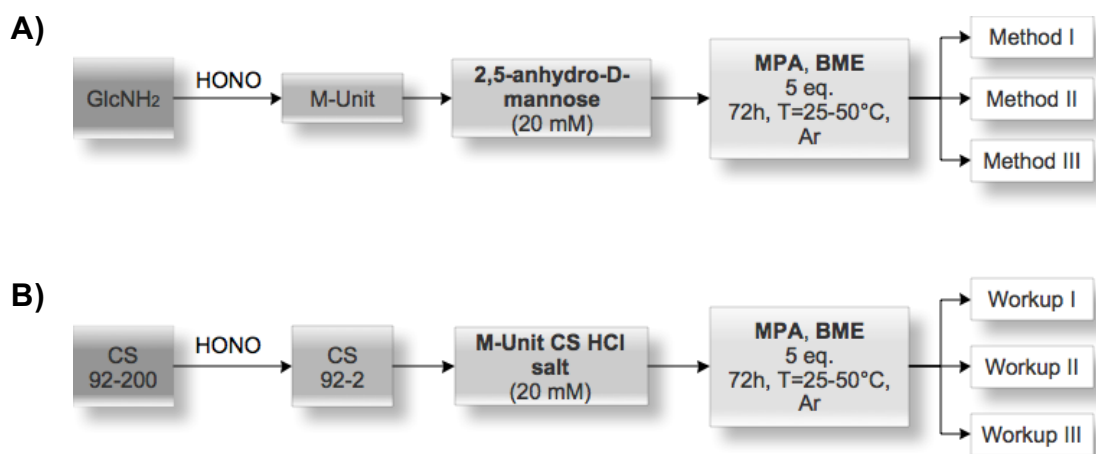


Figure 4.4 : Experimental Design Flowchart. A) Mechanistic studies. Glucosamine (GlcNH₂) was treated with nitrous acid to form the 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) that was reacted with 2

thiol-bearing molecules (β -mercaptoethanol and 3-mercaptopropionic acid, BME and MPA, respectively). The reaction products were treated using one of 3 methods, i.e. Method I: Direct LC-MS analyses to determine to which extent thioacetal formation occurs in situ; Method II: Freeze-drying (FD) + LC-MS analyses to assess the effect of FD on the thioacetal proportion and to ascertain that no by-products appear post FD; Method III: Acetate buffer pH 4 + FD + LC-MS analyses to determine the effect of an increase in pH prior to FD (this pH increase was included here to prevent any CS acid hydrolysis that could occur when Method II, i.e. FD at pH 1, would be transposed to the polymer). B) Chitosan M-Unit reactivity. CS 92-200 was depolymerized with nitrous acid to produce CS 92-2 HCl salt bearing the M-Unit at the cleaved end of the polymer. M-Unit CS 92-2 HCl salt were reacted with MPA and BME and the reaction products treated with one of 3 workups: Workup I: Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to remove all thiol model excess and to determine the in situ thioacetal formation rate; Workup II: FD + Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to determine the effect of FD on the functionalization rate; Workup III: Acetate buffer pH 4 + FD + Dialysis vs. HCl 1mM solution + FD to determine the effect of an increase in pH prior to FD on the functionalization rate (this pH increase was included to prevent any CS acid hydrolysis that could occur during FD at pH 1 in Workup II). The degree of functionalization of the CS conjugates was determined by ^1H NMR, whereas covalent conjugation was assessed by DOSY NMR experiments and Ellman assays in order to rule out the possibility of a simple physical mixture of reagents.

4.3.3.1.1 2,5-Anhydro-D-mannose (M-Unit) synthesis

2,5-Anhydro-D-mannose was synthesized according to Claustre *et al.* (Claustre *et al.*, 1999) Briefly, GlcNH₂·HCl (5 mmol, 1 g) was dissolved in 25 mL degassed ddH₂O and was allowed to stir overnight at room temperature. The colorless reaction medium was cooled down to 0°C and NaNO₂ (12.5 mmol, 862 mg) was added. Dowex® 50WX8-100 [H⁺] resin (42.5 mmol, 8.85 g dried, 25 mL) was added slowly under stirring and the heterogeneous mixture stirred for 4 h at 0-5°C. The H⁺ resin was removed by filtration and the filtrate was neutralized with Dowex® 1X8-50 [CO₃²⁻] resin (60 mmol, 17.14 g dried, 50 mL), flash-frozen and freeze-dried to give the expected yellowish solid with 85% yield.

^1H NMR (500 MHz, D₂O, 25°C, ns=64, d1=6s, acquisition time=2s) δ 3.36-3.40 (m, 2H, H6), 3.91-3.95 (m, 2H, H2 & H5), 4.05-4.08 (t, J=5.6 Hz, 1H, H4), 4.18-4.21 (t, J=5.8 Hz, 1H, H3), 5.09-5.10 (d, J=5.4Hz, 0.88H, H1 *Gem*-diol), 8.46 (s, 0.12H, H1 Aldehyde).

MS (ESI⁺) : [M+H⁺] = 163.0625; [M+Na⁺] = 185.0460 (Expected: [M+H⁺] = 163.0601; [M+Na⁺] = 185.0420)

4.3.3.1.2 2,5-Anhydro-D-mannose (M-Unit) conjugation with thiol-bearing molecules

The synthesized 2,5-anhydro-D-mannose M-Unit (0.1 mmol, 16.2 mg) was dissolved in 5 mL degassed ddH₂O. The pH of the solution was adjusted to 1 with 3 M HCl solution prior to the addition of the thiol-bearing molecule (0.5 mmol, 53.2 mL for MPA and 35.1 mL for BME). The pH was readjusted to 1 with 3 M HCl solution. The reaction mixture was stirred for 72 h at 25°C, under Ar atmosphere and covered with aluminum foil. The reaction mixture turned clear pink-orange after 72 h and was split into 3 parts (Methods I, II and III): the first was dedicated to the direct LC-MS analysis of the reaction medium in order to determine the thioacetal proportion in resulting conjugates that formed *in situ*; the second one was directly flash-frozen and then freeze-dried prior to LC-MS analyses to assess the effect of FD (freeze-drying) on the thioacetal proportion in resulting conjugates and to ascertain that no by-products appear post-FD, whereas the third was treated with 1 M acetate buffer pH 4 before flash-freezing and freeze-drying in order to determine by LC-MS the effect of an increase in pH on the resulting conjugates. It is worth mentioning that Method III was included to prevent any CS acid hydrolysis that could occur when Method II, i.e. FD at pH 1, would be transposed to the polymer.

4.3.3.1.3 Characterization: mass spectrometry

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) data were acquired using an Agilent 6224 LC-TOF mass spectrometer in positive electrospray ion mode, coupled to an Agilent 1260 series liquid chromatography system (Agilent Technologies). Mass Hunter B.06 software (Agilent Technologies) was used to process the data. Separations were carried out at 50°C on an XSELECT CSH™ C18 column (4.6 x 100 mm, 5 mm particles) from Waters. The auto-sampler was maintained at 15°C to avoid sample degradation. The eluents consisted of 0.1% formic acid in water (eluent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (eluent B). The initial mobile phase contained 1% eluent B and was held for 3 min. Eluent B content was increased from 1 to 20% from 3 to 5 min then from 20 to 80% from 5 to 7 min. The system returned to the initial conditions at 7.2 min and was held constant for up to 15 min to allow column equilibration. The injection volume was 1–3 mL. A needle wash solution containing methanol : water (60: 40 v/v) was used after each injection to reduce carry-over. Mass spectra were acquired for *m/z* ranging from 50 to 1200.

Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) experiments were performed using a Thermo Scientific Quantum Ultra triple quadrupole mass spectrometer operated

in positive electrospray ion mode, equipped with a Thermo Scientific Surveyor liquid chromatography system. Xcalibur software (Thermo Scientific) was used to process the data. Separations were carried out on an XSELECT CSH™ C18 column (4.6 x 100 mm, 5 mm particles) from Waters operated under the same chromatographic gradients as those described above. MS/MS spectra were acquired on m/z values for protonated $[M + H]^+$ and sodium adduct $[M + Na]^+$ species of targeted compounds.

4.3.3.2 Chitosan end-group reactivity (Figure 4.4-B)

Chitosan with 92% DDA and $M_n = 200 \text{ kg.mol}^{-1}$ (CS 92-200) was depolymerized with nitrous acid (HONO) to a final molar mass of 2 kg.mol^{-1} (CS 92-2). The final product was kept in its hydrochloride salt form by dialysis vs. HCl 1 mM solution and freeze-drying to minimize CS amines reacting with the M-Unit. This low 2 kDa molar mass was chosen in order to facilitate the elimination by dialysis of unreacted model thiols from the reaction mixture. The CS hydrochloride salt, carrying the 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit), was allowed to react at pH 1 with the two thiol models: 3-mercaptopropionic acid (MPA) and β -mercaptoethanol (BME). Each reaction was allowed to stir for 72 h, at two different temperatures (25 and 50°C) under Ar atmosphere and were treated using three different workups: Workup I: dialysis vs. HCl 1 mM solution followed by freeze-drying (FD) to remove all thiol-bearing molecule excess and to determine the *in situ* thioacetal functionalization degree; Workup II: direct FD, dialysis vs. HCl 1 mM solution and a final FD to determine the effect of FD on the functionalization degree; Workup III: 1 M acetate buffer pH 4 addition to protect CS from acid hydrolysis during FD at pH 1, dialysis vs. HCl 1 mM solution and another FD to assess the effect of an increase in pH prior to FD on the functionalization rate. All conditions implemented are summarized in Figure 4.4. Each final product was characterized by ^1H NMR, Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) (5 mg.mL^{-1} with 2% DCl in D_2O), SEC-MALLS (1 mg.mL^{-1} in duplicates) and free thiol content was determined by Ellman assay (before and after Zn/HCl treatment to reduce any disulfide bond (Erlandsson & Hällbrink, 2005) that would not have been detected by the Ellman method). The following protocols describe the CS preparation as well as examples of the conjugation reactions performed in this study.

4.3.3.2.1 *M-Unit CS 92-2 HCl salt synthesis*

Chitosan was depolymerized using nitrous acid to achieve specific number-average molar mass targets (M_n) of $2 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$. For depolymerization, chitosan (1 g) was dissolved in 184.5 mL ddH₂O and 9.54 mL HCl 1 M solution at 50°C. Then 5.975 mL of fresh sodium nitrite solution ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in ddH₂O obtained by solubilization of 76.5 mg NaNO₂ in 7.65 mL ddH₂O) were added to the completely dissolved CS to reach 0.5% (w/v) chitosan concentration. These conditions correspond to a GlcNH₂ : HONO molar ratio of 6. The viscous colorless mixture was stirred for 3 h at 50°C. The reaction medium was then dialyzed 5x against 4 L of an aqueous solution of HCl at pH 3 (HCl 1 mM solution) over 2 days. The resulting colorless solution was flash-frozen with liquid nitrogen and freeze-dried over 3 days to give the desired white powder with 60-70% yield.

¹H NMR (500 MHz, D₂O, 70°C, ns=64, d1=6s, acquisition time=2s) δ 2.06 (s, 3.16H, NHAc), 3.14-3.21 (br, 13H, H2D), 3.51-3.56 (br, 1H, H2A), 3.68-3.95 (m, 70H, H3-H6), 4.12 (br, 1H, H5M), 4.21-4.31 (br, 1H, H4M), 4.43 (br, 1H, H3M), 4.61 (br, 1H, H1A), 4.87-4.89 (m, 13H, H1D), 5.08 (d, J=5.0 Hz, 1H, H1M *Gem*-diol).

SEC-MALLS : $M_n = 2342 (\pm 11) \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $M_w = 3117 (\pm 4) \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; PDI = 1.332 (± 0.008)

4.3.3.2.2 *M-Unit CS 92-2 HCl salt conjugation with thiol-bearing molecules*

CS 92-2 HCl salt (0.035 mmol, 70 mg) and thiol-bearing model molecules (0.175 mmol, 25.4 mL for MPA, 12.3 mL for BME) were solubilized in 1.73 mL degassed ddH₂O. The pH of the reaction medium was adjusted to 1 with 3 M HCl. The reaction medium was stirred for 72 h at either 25 or 50°C under Ar atmosphere. The resultant colorless liquid was directly flash-frozen with liquid nitrogen and then freeze-dried over 3 days. The freeze-dried white solid was solubilized in 5 mL ddH₂O and dialyzed 5x against 2 L HCl 1 mM solution to remove unreacted thiols. The colorless solution was flash frozen and freeze-dried to give the expected white solid with typically 70-80% yield.

Addition of BME (Annexe B, Figure 7.4): ¹H NMR (500 MHz, D₂O/DCl, 70°C, ns=64, d1=6s, acquisition time=2s) δ 2.06 (s, 5.89H, NHAc), 2.91-2.95 (br, 2.78H, BME-CH₂S), 3.17-3.21 (br, 20H, H2D), 3.51-3.53 (br, 1H, H2A), 3.69-3.95 (m, 105H, H3-H6), 4.12-4.14 (br, 1H, H5M), 4.24-4.25 (br, 1H, H4M), 4.57-4.59 (br, 1H, H3M), 4.61-4.62 (br, 1H, H1A), 4.91-4.92 (m, 20H, H1D), 5.08-5.09 (d, J=5.0 Hz, 0.30H, H1M *Gem*-diol).

SEC-MALLS: $M_n = 3177 (\pm 57) \text{ g.mol}^{-1}$; $M_w = 3680 (\pm 66) \text{ g.mol}^{-1}$; PDI = 1.160 (± 0.003)

Addition of MPA (Annexe B, Figure 7.5): ^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$, 70°C , $n_s=64$, $d_1=6s$, acquisition time=2s) δ 2.06 (s, 4.18H, NHAc), 2.74-2.77 (t, $J=7.1$ Hz, 2.33H, MPA- $\text{CH}_2\text{-CO}$), 2.97-3.01 (q, $J=6.8$ Hz, 1.78H, MPA- CH_2S), 3.15-3.24 (br, 17H, H2D), 3.51-3.56 (br, 1H, H2A), 3.69-3.95 (m, 91H, H3-H6), 4.11 (br, 1H, H5M), 4.21-4.23 (br, 1H, H4M), 4.55 (br, 1H, H3M), 4.62 (br, 1H, H1A), 4.87-4.92 (m, 17H, H1D), 5.08 (d, $J=5.0$ Hz, 0.47H, H1M *Gem*-diol).

SEC-MALLS: $M_n = 3053 (\pm 81) \text{ g.mol}^{-1}$; $M_w = 3564 (\pm 48) \text{ g.mol}^{-1}$; PDI = 1.182 (± 0.016)

4.3.3.2.3 Ellman assays

Thiol-derivatized CSs were analyzed using the Ellman assay to assess the presence of free thiols within the products. Ellman stock solutions (50 mM sodium acetate, 2 mM DTNB) were prepared by dissolving 39.7 mg of Ellman reagent and 205.1 mg of sodium acetate in 50 mL double deionized water (ddH_2O). Tris 1 M dilution buffer was prepared dissolving 6.1 g of Tris in 50 mL ddH_2O and adjusting the pH to 8.0 using HCl 1.0 M standard solution. Thiol concentrations were measured in triplicate by mixing 50 mL of Ellman stock solution with 100 mL of Tris dilution buffer and 10 mL of sample solution. After 15 min the mixture was diluted by the addition of 840 mL of ddH_2O and the absorbance at 412 nm read using a microplate reader Tecan Infinite® M200. Thiol concentrations were calculated from a standard curve prepared using either MPA or BME and measurements were performed in triplicates in a 96-well plate using 150 mL sample volumes. The CS used as starting material was dissolved at the appropriate concentration for each sample and used as a blank. Both NaOH and Zn/HCl treatments of the CS adduct solutions were implemented on separate samples to determine the presence of hemithioacetal intermediates and any disulfide bond formation within the final product by the Ellman assay, respectively. Concentrated 1 M NaOH and 1 M HCl solutions were used to minimize changes in CS concentration. After 45-60 min constant agitation of the reaction media, Ellman assays were performed using 10 mL of alkali sample solution for NaOH treatment. Zn/HCl treated samples were obtained by adding few mL of 1 M HCl (to reach pH 1) and 5 equivalents of Zn dust per CS; the supernatants were analyzed after centrifugation (1000g for 1 min).

4.3.3.2.4 Characterization: NMR and SEC-MALLS

The deacetylation degree (DDA) of chitosan was determined by ^1H NMR spectroscopy as previously described (Lavertu, M. *et al.*, 2003) using a Bruker Avance 500 spectrometer equipped with a Bruker 5 mm BBFO probe. Cross-polarization magic-angle spinning (CPMAS) and Bloch-decay (BD) ^{13}C NMR spectra were collected on a Bruker Avance 600 instrument equipped with a Bruker 4 mm BL4 CPMAS probe and samples were spun at the magic angle (54.7°) at a rate of 10-12 kHz. Diffusion ordered spectroscopy experiments (DOSY) were conducted on a Bruker II 400 equipped with a Bruker Diff30 probe, using 32 gradients between 11.2 and 358.4 gauss per cm with a gradient pulse (δ) of 1 ms, a diffusion time (Δ) of 60 ms.

Molar mass of starting 92% DDA chitosan was determined by size-exclusion chromatography (SEC) as previously described (Lavertu, M *et al.*, 2012). Measurements were acquired using a gel permeation chromatography system equipped with an LC-20AD isocratic pump, SIL- 20AC HT autosampler, and CTO-20AC oven (Shimadzu). This setup was coupled to the following detectors: Dawn HELEOS II multiangle laser light scattering, Viscostar II viscosimeter and Optilab rEX interferometric refractometer (Wyatt Technology Co.). The starting materials were eluted through two Shodex OHpak columns (SB-806M HQ and SB-805 HQ) connected in series with a mobile phase composed of 0.15 M acetic acid, 0.1 M sodium acetate, 0.4 mM sodium azide, 0.1 M NaCl, pH 4.5 (Nguyen, S. *et al.*, 2009). A dn/dc value of 0.214 (DDA = 92%) was used and the number and weight average molar masses (M_n and M_w) of the CS starting materials were found to be $193 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ and $242.5 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ respectively.

Modified CS (depolymerized CS and thiol-coupled CSs) were analyzed in SEC using the same conditions but with columns SB-806M HQ and SB-803 HQ that are more suitable for the analysis of low molecular weight chitosans.

4.3.3.2.5 Quantitation of CS derivatization efficiency: functionalization degree (F) calculations

The functionalization degrees (F) of each conjugation were calculated according to the following equations (Eqn):

$$F = \frac{\frac{1}{\alpha} \sum \int H_{\text{Thiol peaks}}}{\frac{1}{\beta} \sum \int H_{\text{M-Unit peaks}}} \times 100 \quad \text{Eqn (1)}$$

Where $H_{Thiol\ peaks}$ refers to the well-defined proton peaks of the thiol-bearing molecule conjugated to CS and $H_{M-Unit\ peaks}$ corresponds to the well-defined M-Unit characteristic proton peaks. Both integrations in Eqn (1) are normalized to the number of protons used for the calculation, namely α and β for the thiol-bearing molecule and M-Unit, respectively.

According to the mechanistic studies on the M-Unit model presented below, the hemithioacetal intermediate is fully stabilized into the corresponding thioacetal (as shown in Figure 4.3, reaction 4 and Figure 4.5) after freeze-drying of the reaction mixture in acidic conditions, thus two thiol-bearing molecules per M-Unit CS salt were considered for the calculation of the functionalization degree (F). For MPA adducts, two well-defined peaks corresponding to $-CH_2-S-$ and $-CH_2-CO-$ protons (i.e. 8 protons) appear on the NMR spectra. However, for BME adducts, only the $-CH_2-S-$ peak is visible on the spectra, in agreement with NMR spectrum simulation (Banfi & Patiny, 2008) that predicts that $-CH_2-CO-$ peak is hidden by the CS H3-H6 broad peaks (Lavertu, M. *et al.*, 2003). Thus, α values of 4 and 8 in Eqn (1) were used for BME and MPA, respectively. For the M-Unit, the well-defined peaks corresponding to H4M and H5M protons were used for integration and a β value of 2 was thus used in the equation. From the above considerations, Eqn (1) can be rewritten as Eqn (2) and Eqn (3) for BME and MPA conjugates, respectively:

$$F_{BME} = \frac{\frac{1}{4} \int H_{CH_2-S}}{\frac{1}{2} \int (H_4M + H_5M)} \times 100 \quad \text{Eqn (2)}$$

$$F_{MPA} = \left[\frac{\frac{1}{8} \left(\int H_{CH_2-S} + \int H_{CH_2-CO} \right)}{\frac{1}{2} \int (H_4M + H_5M)} \right] \times 100 \quad \text{Eqn (3)}$$

Where the protons used for integration are defined in Figure 4.5, for purified BME and MPA chitosan adducts.

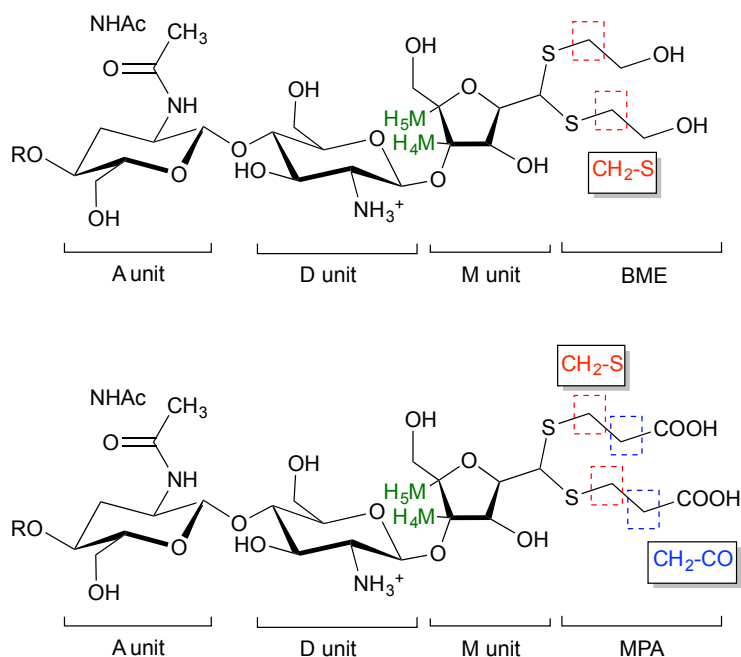


Figure 4.5 : Structure of BME (top) and MPA (bottom) chitosan adducts. The protons corresponding to the ¹H NMR peaks used for the calculations of the functionalization degree in Eqn (2) and Eqn (3) are highlighted.

Similarly, CS PEGylation efficiency (F_{PEG}) was also calculated by adapting Eqn (1) with the PEG characteristic peak integrations:

$$F_{PEG} = \frac{\frac{1}{6} \int H_{PEG-OCH_3}}{\frac{1}{2} \int (H_4M + H_5M)} \times 100 \quad \text{Eqn (4)}$$

where $H_{PEG-OCH_3}$ refers to the well-defined methyl protons (3 H) peaks located at the end of the PEG chain ($\alpha=6$ as there are 2 PEG chains per CS).

4.3.4 CS-b-PEG₂ block-copolymer

4.3.4.1 CS-b-PEG₂ block-copolymer formation

In order to reduce any mPEG-SS-PEGm disulfide bonds, mPEG-SH (2 kDa, m = 200 mg, 0.1 mmol) was solubilized in 2 mL Zn/HCl pH 1 solution ($m(\text{Zn}) = 9.8 \text{ mg}$, 0.15 mmol) and the mPEG-SH solution stirred for 1 h. The clear colorless reduction medium was centrifuged at 1000g for 2 min prior to CS conjugation.

M-Unit CS 92-10 HCl salt (m = 100 mg, 0.01 mmol, 5 mM aldehyde) was added to the reduced mPEG-SH solution and the pH of the reaction medium was adjusted to 1 with HCl 3 M solution. The reaction medium was stirred for 72 h at 50°C, under Ar atmosphere. At the end of the reaction, the reaction medium was flash-frozen and freeze-dried. Unreacted mPEG-SH was discarded by reprecipitation in 5x 45 mL CH₂Cl₂. The remaining white pellet was dried under reduced pressure overnight.

¹H NMR (Figure 4.8) (500 MHz, D₂O, 70°C, ns=64, d1=6s, acquisition time=2s) δ 2.06 (s, 11H, NHAc), 3.14-3.22 (br, 46H, H2D), 3.37 (s, 3.67H, PEG-OCH₃), 3.51-3.56 (br, 3H, H2A), 3.69 (s, 181H, PEG Chain -O-CH₂-CH₂), 3.75-3.95 (m, 238H, H3-H6), 4.12-4.14 (br, 1H, H5M), 4.21-4.23 (br, 1H, H4M), 4.61 (br, 3H, H1A), 4.88-4.90 (m, 46H, H1D), 5.08 (d, J=5.0 Hz, 0.49H, H1M Gem-diol).

4.3.4.2 CS-b-PEG₂ and CS/pDNA polyplexes formation

Polyplexes were prepared as previously described (Lavertu, M. *et al.*, 2006). Briefly: CS-b-PEG₂ and depolymerized unmodified chitosan (CS 10 kDa with 92.5% DDA) stock solutions were prepared by dissolution at 0.5% (w/v) in hydrochloric acid using a glucosamine : HCl ratio of 1 : 1. Polymer stock solutions were diluted with ddH₂O to reach the amine to phosphate ratio of 3.7 (N/P = 3.7) when equal volumes of chitosan and pDNA (100 mg.mL⁻¹) solutions would be mixed. Both CS-b-PEG₂/pDNA and CS/pDNA polyplexes were prepared at room temperature, by adding 100 mL of the diluted polymer solution to 100 mL of the pDNA solution followed by immediate mixing by pipetting up and down. The polyplexes were analyzed for their size and morphology by dynamic light scattering (DLS) and environmental scanning electron microscopy (ESEM) 1 h after their formation.

4.3.4.3 Polyplex characterization

Average diameters (Z-Average) of chitosan/pDNA and CS-b-PEG₂/pDNA polyplexes were determined by dynamic light scattering (DLS) at an angle of 173° at 25°C, using a Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, UK). Samples ($N = 2$) were measured in triplicate using the viscosity of pure water in calculations.

Environmental scanning electron microscopy (ESEM) imaging of the polyplexes was performed as previously described (Niebel *et al.*, 2014) using an environmental scanning electron microscope, Quanta 200 FEG (FEI Company Hillsboro, OR), operated in high vacuum mode with accelerating voltage = 20.0 kV; spot size = 3 and working distance = 5 mm.

4.4 Results and discussion

4.4.1 Aldehyde availability

Since hemithioacetal formation requires the dehydrated aldehyde as reactive species (referred to as aldehyde in this manuscript), the CS aldehyde availability was assessed by NMR spectroscopy.

4.4.1.1 Chitosan 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) - *gem*-diol ubiquity

Raw CS was depolymerized using HONO to a final molar mass of 1 kg.mol^{-1} (CS 92-1). This low M_n was chosen to increase the concentration of aldehyde moieties, facilitating their detection by ^1H NMR spectroscopy. The use of deuterated solvent for the depolymerization reaction in this study allowed direct NMR analysis of the reaction mixture (Annexe B, Figure 7.3). In the ^1H NMR spectrum, no aldehyde group was observed either at 9-9.5 ppm (the expected aldehyde proton chemical shift), or at 8.5 ppm (for the M-Unit model) despite the use of a large number of scans (2000). However, its hydrated form, the *gem*-diol peak at 5.09 ppm was omnipresent within the reaction medium. It is worth mentioning that the absence of the dehydrated form in the NMR spectrum is not due to a fast exchange between the hydrated and dehydrated forms since both forms were detected for the 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit).

4.4.1.2 Equilibrium is strongly displaced towards the *gem*-diol form for the M-Unit CS

The hydrated form of the aldehyde was the only form detected in each liquid NMR analysis, either at 25°C (data not shown) or 70°C (Annexe B, Figure 7.3) It is worth mentioning that these analyses were performed in D_2O and/or $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$, which are favorable conditions for the hydrated form or *gem*-diol formation (Bell, 1966). Some authors also reported an increase in the acetaldehyde carbonyl hydration equilibrium constant ($K_{\text{hyd}} = [\textit{gem}\text{-diol}]/[\text{aldehyde}]$) from 0.85 to 0.99 when experiments are performed in ddH_2O and D_2O respectively, showing that the equilibrium can be displaced towards the formation of *gem*-diol in deuterated solvents (Bell, 1966; Lienhard & Jencks, 1966). In order to eliminate the contribution of the aqueous solvent on this equilibrium and to favor a displacement towards the aldehyde or unhydrated form of the CS end unit, 1 kg.mol^{-1} M-Unit CS HCl salt was analyzed by solid-state NMR (CP-MAS). Fully deacetylated CS (CS 99-1) was preferred to the CS 92-1 to avoid any confusion between the carbonyl chemical shift of the acetyl peak and the aldehyde peak. The same sample was analyzed at two different frequencies (10 kHz

and 12 kHz) to detect the eventual presence of harmonics within the spectrum. All peaks corresponded to chemical moieties attributed according to Heux *et al.* (Heux *et al.*, 2000) (data not shown). The CS salt did not form any Schiff base product, as expected (since protonated amines are not nucleophilic); however, no aldehyde peak was detected in these spectra.

It has been reported that hydration of an aldehyde in the gas-phase can be observed at a relative humidity (RH%) level as low as 5% (Axson *et al.*, 2010). The relative humidity of the laboratory where the experiments were performed was between 20 and 50%, and it could be that all aldehyde groups were transformed into *gem*-diols during the sample transfer and preparation. To eliminate the exposure to air humidity that might favor this formation of the *gem*-diol, an inert atmosphere solid-state NMR experiment was implemented on an extra-dried CS 99-1 salt (freeze-dried over 3 days and then dried using a Speed-Vac Plus centrifuge at 60°C, overnight under reduced pressure). Sample preparation was performed within an Ar glove box to verify if air humidity transforms the CS terminal aldehyde into its corresponding hydrate. The solid-state NMR analysis was conducted under an inert atmosphere as well (constant N₂ flow). Neither the aldehyde peak (expected around 190 ppm; (Saito *et al.*, 1987)) nor the *gem*-diol peak (expected around 90 ppm; (Tømmerraas, K *et al.*, 2001)) were visible on the spectrum. It is worth mentioning that the expected chemical shift of the *gem*-diol falls within the range of chemical shifts corresponding to C3-C5 peaks and the former is most probably hidden by the latter (Annexe B, Figure 7.6). In order to confirm that the absence of the *gem*-diol in the spectrum was not due to an unexpected side reaction occurring in the preparation of the chitosan sample, the dried sample was subsequently dissolved in D₂O and analyzed by standard ¹H NMR. This analysis revealed that the hydrated aldehyde form was present at the expected quantitative proportion, as established from CS Mn and DDA values (data not shown).

4.4.1.3 H-bonding could stabilize the M-Unit CS *gem*-diol

Although for most aldehydes and ketones the hydrates are generally less stable than their respective parent (Bell, 1966), their equilibrium can be displaced towards the *gem*-diol form by making the carbonyl more electropositive. Thus, the *gem*-diol form can predominate when the aldehyde is located close to a functional group allowing a negative inductive effect. For CS, some suitable electron-withdrawing substituents, such as hydroxyl and hemiacetal substituents might create a weak negative inductive effect, thereby increasing slightly the δ^+ charge on the carbon of the

carbonyl and favouring water nucleophilic attack. Since CS offers significantly more H-bond donors than 2,5-anhydro-D-mannose, intermolecular H-bonding may be responsible for the strong predominance of the *gem*-diol form (Schulman *et al.*, 1976). This hypothesis was confirmed with the ^1H NMR analysis of the synthesized 2,5-anhydro-D-mannose that presents a detectable proportion of the aldehyde in ^1H NMR spectroscopy (around 10% of the aldehyde form, data not shown). The NMR experiments described above suggest that the M-Unit CS aldehyde is only present in trace amounts since only the *gem*-diol form was detected. Nonetheless these trace amounts are reactive enough to be engaged with nucleophiles such as CS amines (Schiff base formation) or more particularly with thiol moieties (Figure 4.1 & Figure 4.3).

4.4.2 Mechanisms of conjugation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) and thiol-bearing molecules

The reactivity of aldehydes toward thiols in aqueous conditions was assessed semi-quantitatively by LC-MS using the 2,5-anhydro-D-mannose as an aldehyde model.

4.4.2.1 Expected products of thiol conjugation to aldehydes include hemithioacetal, thioacetal, oxathiolane and α,β -unsaturated sulfide intermediate

The expected products of all conjugations implemented with thiol-bearing molecules (MPA and BME) include hemithioacetal, thioacetal, oxathiolane and α,β -unsaturated sulfide intermediate (Figure 4.6). The first thiol attack on the aldehyde forms a hemithioacetal intermediate (A), which is in equilibrium with its corresponding protonated hemimercaptal form (oxonium) via a proton transfer. This structure may react in several ways: it could be stabilized with a second nucleophilic attack forming the corresponding thioacetal (C) after water removal; another hypothetical pathway is the formation of an α,β -unsaturated sulfide intermediate (D) through an elimination process; the final possible product concerns the BME adducts that could form oxathiolane-derivatized adducts (B), but this possibility is slight given their fast hydrolysis compared to the thioacetal (Fournier *et al.*, 1975; Satchell & Satchell, 1990).

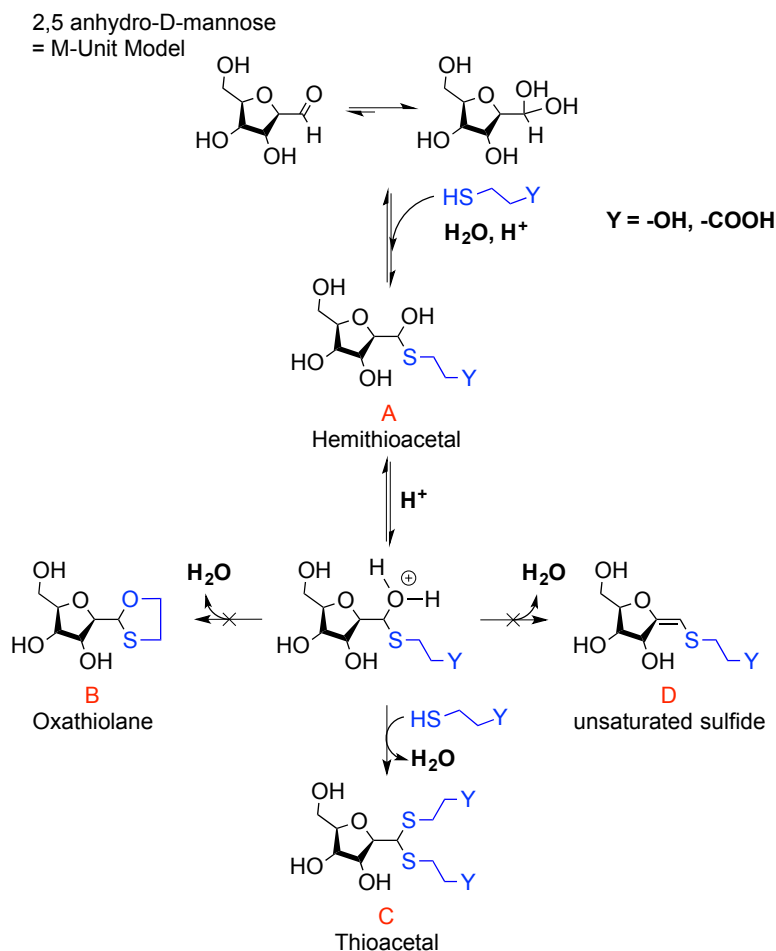


Figure 4.6 : Schematic representation of potential reactions occurring during conjugation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) and 2 thiol-bearing models (3-mercaptopropionic acid and β -mercaptoethanol, MPA and BME respectively) giving the following expected products: product A is the hemithioacetal intermediate that is in equilibrium with its corresponding oxonium, whereas products B and C correspond to the oxathiolane (for BME reactions only) and thioacetal, respectively. Molecule D represents the α,β -unsaturated sulfide. The results of this study suggest that the thioacetal C corresponds to the only stable form observed after freeze-drying.

4.4.2.2 Low in situ stabilization of hemithioacetals

Five equivalents of thiolated molecules (BME and MPA) per M-Unit aldehyde/*gem*-diol were reacted with a synthesized 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit model) for 72 h at pH 1, under inert atmosphere. The relative proportions of the final expected compounds were calculated from LC-MS chromatogram integrations of specific m/z values corresponding to both proton and sodium adducts ($[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$) within the same run (Table 4.1). This semi-quantitative

evaluation was possible since the expected final products have similar structures and thus expected similar ionization behaviors. Direct LC-MS analyses (Table 4.1) of the reaction media (Method I, Figure 4.4) indicated that the hemithioacetal intermediate A corresponded to the major observed compound (75%), the minor product being the stable thioacetal C (25%), after 72 h reaction. A highly similar 4 : 1 ratio of hemithioacetal to thioacetal was observed for all thiol models (BME and MPA) tested. Thus the stabilization to the thioacetal intermediate A seems to occur with a second thiol nucleophilic attack to form the corresponding thioacetal C with the release of water. However, our results suggest that this stabilization occurs only to a relatively low extent in aqueous medium.

4.4.2.3 Freeze-drying facilitates the hemithioacetal stabilization

Water removal by freeze-drying (FD) is the key-step in Schiff base formation occurring between CS amines and CS terminal aldehyde (Tømmerraas, K *et al.*, 2001). A similar effect might be at play in the reaction with thiolated species. In order to assess whether or not FD could favor a second thiol nucleophilic attack to stabilize the structure, Method II (direct FD of the reaction medium, Figure 4.4) was implemented. This strategy resulted in the synthesis of the thioacetal C without any detectable quantity of hemithioacetal A, as deduced from LC-MS analysis. These trends were also observed using Method III (increase in pH with 1 M acetate buffer pH 4 followed by FD, Figure 4.4), initially proposed to prevent any CS acid hydrolysis that could occur when this method would be transposed to the polymer CS. Reaction mixtures that were treated this way resulted in a significant increase, when compared to Method I, of the relative proportion of stabilized thioacetal C *vs.* hemithioacetal A, corresponding to 96% and 82% thioacetal C for BME and MPA respectively (Table 4.1).

It is worth mentioning that the LC-MS analyses only provide the relative proportion of observed species so that similar results obtained with both Methods II and III do not necessarily corresponds to equivalent absolute conversion rates. For instance, since the hemithioacetal formation equilibrium is pH-sensitive (Barnett & Jencks, 1967) (increase in pH is known to displace the equilibrium towards the starting materials), the increased relative proportion of thioacetal C observed with Method III *vs.* Method I could be due to a reduction of the absolute amount of hemithioacetal A in the reaction mixture. The conversion degrees or functionalization degrees are calculated below by ^1H NMR of the purified conjugated polymers.

The oxathiolane B and α,β -unsaturated sulfide products D appeared as traces in both Methods II and III (Table 4.1). LC-MS chromatograms revealed the same elution time as for thioacetals C, suggesting an in-source decomposition of B/C into their respective D form. The hypothesis that the oxathiolane B was formed within the MS apparatus by the ionization of the thioacetal C was confirmed by LC-MS/MS analyses of the C adduct obtained from the reaction of the M-Unit and MPA: the fragmentation of C produced compound D (data not shown).

These experiments suggest that the oxonium intermediate (which is in equilibrium with the hemithioacetal intermediate) is stable enough to favor the thioacetal formation notwithstanding the unsaturated compound D formation. The freeze-drying step apparently orients the reaction towards the stable thioacetal formation, more likely due to an increase in concentration by water removal to facilitate the second nucleophilic attack.

Table 4.1 : Expected product (Figure 4.6) proportions as deduced from LC-MS analyses. Percentages represent the relative proportion of expected final molecules resulting from each conjugation that were implemented in triplicates ($N \geq 3 \pm \text{SD}$): (A) hemithioacetal intermediate, (B) oxathiolane (for β -mercaptoethanol only), (C) thioacetal, (D) α,β -unsaturated sulfide. Calculations are based on chromatogram peak integrations of both proton and sodium adducts of a specific chemical formula. The m/z value given in parentheses represents the thioacetal in-source decomposition observations. Method I refers to direct LC-MS analysis of the reaction medium; Method II corresponds to the direct freeze-drying (FD) of the reaction medium before analysis; Method III corresponds to an increase in pH with acetate buffer pH 4 followed by FD. With both models, the hemithioacetal intermediate is stabilized by FD into the corresponding thioacetal. LC-MS/MS experiments rule out the possible formation (post-FD) of both oxathiolane and α,β -unsaturated sulfide (B and D forms in Figure 4.6, respectively).

Model	Final product (see Fig. 6)	Chemical formula	Expected m/z		Observed m/z		Relative proportion (%)		
			$[\text{M} + \text{H}]^+$	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	$[\text{M} + \text{H}]^+$	$[\text{M} + \text{Na}]^+$	Method I	Method II	Method III
M-Unit + BME	A	$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_6\text{S}$	241.0740	263.0560	—	263.0550	75 ± 13	—	4 ± 3
	B and D	$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_5\text{S}$	223.0635	245.0454	—	(245.0450)	—	—	—
	C	$\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6\text{S}_2$	301.0774	323.0590	301.0884	323.0577	25 ± 13	100	96 ± 3
M-Unit + MPA	A	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_7\text{S}$	269.0689	291.0509	—	291.0502	76 ± 3	—	18 ± 7
	C	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_8\text{S}_2$	357.0672	379.0492	—	379.0483	24 ± 3	100	82 ± 7
	D	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_6\text{S}$	251.0584	273.0403	(251.0563)	(273.0386)	—	—	—

4.4.3 M-Unit chitosan HCl salt reactivity

4.4.3.1 Chitosan HCl salt maintains the M-Unit integrity after freeze-drying

The 2,5-anhydro-D-mannose unit (M-Unit) resulting from CS depolymerization using HONO is not stable after rehydration in aqueous acidic conditions. Indeed, when the reaction medium is neutralized, the reaction between CS amines and the M-Unit aldehyde moiety produces a reversible imino bond (Schiff base formation), which is accompanied with the release of water (Figure 4.1, reaction 3). It has been demonstrated that after FD, which is accompanied by Schiff base formation via equilibrium displacement, the solubilization of CS in acidic conditions (pH below 5) cleaves 2,5-anhydro-D-mannose unit from CS into hydroxymethylfurfural (HMF; (Tømmerraas, K *et al.*, 2001)) (Figure 4.1, reaction 4). In terms of reactivity, the M-Unit is available within the reaction medium after HONO treatment but its concentration is limited to that of the depolymerization medium (0.5% w/v in our case, corresponding to a concentration of reactive units of 2.5 mM for CS with $M_n = 2 \text{ kg.mol}^{-1}$). Higher CS depolymerization concentrations are possible (typically up to 2% w/v for CS with M_n of a few hundreds of kg.mol^{-1}) but are limited by the high viscosity of the CS solutions, which may compromise the stirring efficiency and homogeneity of the depolymerization medium. In order to maintain the M-Unit integrity and to work in a more concentrated regime, the depolymerized (i.e. less viscous) CS hydrochloride salt was freeze-dried, with all CS amines protonated, thus avoiding Schiff base formation and subsequent HMF formation upon rehydration. All the CSs that were prepared this way still carried their M-Unit after rehydration (M-Unit remaining $\geq 80\%$), allowing higher CS concentration than the depolymerization medium (4% w/v vs. 0.5% w/v, respectively).

The covalent nature of the conjugation of the CS HCl salt M-Unit to thiol-bearing molecules was confirmed by the Ellman assay where no free thiol moieties were detected after rehydration of the modified polymers. Note that free thiol moieties were not detected after Zn/HCl treatment that would have reduced any disulfide bond potentially formed in the course of the conjugation reaction and/or post-reaction workup. The absence of any hemithioacetal intermediate (base-sensitive) was also confirmed by performing the Ellman assay on the product after exposure to 1 M sodium hydroxide solution. Purified CS-thiol adducts were also analyzed by diffusion ordered spectroscopy (DOSY), a spectroscopic method that distinguishes compounds according to their respective translation diffusion coefficient (Annexe B, Figure 7.7), shows that both CS and thiol-

bearing models have the same diffusion coefficient in D₂O at 25°C, despite significant molar mass differences (2300 g.mol⁻¹ vs. 106 g.mol⁻¹, for M-Unit CS HCl salt and MPA respectively). Altogether, the afore-mentioned controls confirmed the presence of the thioacetal linkage between the CS HCl salt M-Unit and both thiol-bearing model species. The results of the conjugation efficiencies between CS and BME or MPA were calculated using Eqn (2) and Eqn (3), respectively and are summarized in Table 4.2.

4.4.3.2 NMR and LC-MS analyses indicate that two thiol-bearing molecules regioselectively react with the CS M-Unit aldehyde to form a thioacetal

The regioselectivity of the CS M-Unit aldehyde conjugation to the thiol models was assessed by 2D NMR experiments (COSY and HMBC, data not shown) in order to detect long-range correlations between the M-Unit and the thiol characteristic peaks. However, such correlations were not visible in the NMR spectra, most probably because of the inherently low concentration of the end-group conjugated thiols within the synthesized structures and/or because the atoms to correlate are separated by a large number of bonds (3 and 4 for proton–carbon and proton–proton correlation, respectively - see Figure 4.5), especially for the COSY experiments (Pinto *et al.*; Claridge, 1999). Moreover, the HMBC measurements were found to be insensitive, particularly with poorly resolved ¹H-¹H multiplets (Annexe B, Figure 7.4 & Figure 7.5) (Bax *et al.*, 1996; Furrer, 2010).

Despite the inability of these 2D NMR experiments to reveal the expected correlations, the combined NMR and LC-MS analysis indicated that two thiol-bearing molecules react regioselectively with the aldehyde of the terminal M-Unit of chitosan. As discussed above, the MS experiments performed with the mannose monomer indicated clearly that the stabilized form is the thioacetal form, so that, two thiols are expected to react similarly with the M-Unit of chitosan. This expected stoichiometry and regioselectivity for thiol-bearing molecules reacting on chitosan was validated by monitoring the relative proportion of *gem*-diol. Indeed, the *gem*-diol signal should decrease concomitantly with the conjugation of thiols onto the M-Unit of chitosan (one *gem*-diol consumed for two conjugated thiols). The calculated conjugation efficiencies obtained with either Eqn (2) (BME) or Eqn (3) (MPA) and the following equation should therefore be the same if the two thiols react regioselectively onto the terminal aldehyde function of chitosan:

$$F = \frac{\frac{1}{2} \sum \int (H_4 M + H_5 M) - \int H_{\text{Gem-Diol}}}{\frac{1}{2} \sum \int (H_4 M + H_5 M)} \times 100 \quad \text{Eqn (5)}$$

where H4M and H5M are protons with well-defined NMR peaks from the M-Unit shown in Figure 4.5 (unchanged by the reaction of the aldehyde with thiol-bearing molecules) and $H_{\text{gem-Diol}}$ is the H1 proton of the *gem*-diol form of CS M-Unit shown in Annexe B, Figure 7.3. It is worth mentioning that efficiency calculation using Eqn (5) is independent of the reaction stoichiometry and relies only on the assumption that any thiol-bearing molecule will react selectively with the terminal unit of chitosan.

For all conjugation reactions performed in this study, the conjugation efficiencies calculated with both approaches, namely with Eqn (2) (BME) or Eqn (3) (MPA), which both rely on the reaction stoichiometry, or Eqn (5) that is independent from stoichiometry and relies only on the relative proportion of *gem*-diol vs. M-Unit, were found to be in very close agreement (Table 4.2). These results indicate that (1) thiol-bearing molecules react selectively with the terminal aldehyde functional group of chitosan, and (2) the thioacetal is the only stable form of product observed.

Table 4.2 : Efficiency of conjugation of the M-Unit CS HCl salt to 5 equivalents of thiol-bearing molecules (3-mercaptopropionic acid and β -mercaptoethanol, MPA and BME respectively) per CS end unit for 72 h at pH 1. Reaction media were treated according to the following workups: Workup I (dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD); Workup II (FD + dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD); Workup III (increase in pH with acetate buffer pH 4 + FD + dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD). *F* below corresponds to the functionalization degree, considering 2 thiol molecules per potential aldehyde and calculated using Eqn (2) for BME and Eqn (3) for MPA with $N \geq 3$ (\pm SD). *F* was also calculated using Eqn (5), considering only the relative proportion of the remaining *gem*-diol per M-Unit. (* corresponds to the results of the conjugations implemented with 20 equivalents (instead of 5) of thiol-bearing molecule per end unit)

Thiol-bearing molecule	Temperature (°C)	Workup I		Workup II		Workup III	
		<i>F</i> (%)		<i>F</i> (%)		<i>F</i> (%)	
		eqn (2) and (3)	eqn (5)	eqn (2) and (3)	eqn (5)	eqn (2) and (3)	eqn (5)
BME	25	2 (\pm 1)	3 (\pm 1)	18 (\pm 2)	18 (\pm 1)	11 (\pm 2)	11 (\pm 1)
	50	26 (\pm 2)	24 (\pm 1)	42 (\pm 2)	42 (\pm 3)	24 (\pm 1)	24 (\pm 0)
		68 (\pm 1)*	69 (\pm 1)*	70 (\pm 1)*	70 (\pm 1)*	—	—
MPA	25	10 (\pm 1)	11 (\pm 1)	18 (\pm 2)	19 (\pm 2)	15 (\pm 1)	13 (\pm 2)
	50	14 (\pm 1)	13 (\pm 1)	54 (\pm 5)	55 (\pm 2)	18 (\pm 1)	17 (\pm 1)
		56 (\pm 1)*	55 (\pm 1)*	59 (\pm 1)*	58 (\pm 1)*	—	—

4.4.3.3 The stabilization rate of the product from the hemithioacetal to thioacetal form within the reaction medium can be enhanced by FD

For reactions performed using 5 equivalents of thiol-bearing molecule per aldehyde, the first workup tested here (Workup I: dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD) showed a limited conversion into the desired conjugates ($F = 2\%$ and 10% as conversion degrees, for BME and MPA at 25°C respectively; Table 4.2). Similar results were obtained for Workup III (increase in pH with acetate buffer pH 4 + FD + dialysis vs. HCl 1mM solution + FD) with $F = 11\%$ and 15% at 25°C , for BME and MPA, respectively (Table 4.2), whereas significantly higher functionalization degrees were obtained for Workup II (FD + dialysis vs. HCl 1 mM solution + FD) where $F = 18\%$ at 25°C , for both BME and MPA (Table 4.2). Similar trends were observed for reactions performed at 50°C but with an overall increase in functionalization degrees (further discussed in the following section). These results suggest that FD favors the second thiol nucleophilic attack to stabilize the hemithioacetal structure, possibly by concentrating the reaction medium. This FD effect is only seen in Workup II since in Workup I, all thiol-bearing molecules were removed by dialysis prior to FD, whereas in Workup III, most of the hemithioacetal intermediate was readily transformed into the starting reactants by an increase in pH. Thus, one of the reacting species is absent (or present in very low amount) during the last FD step in Workup I (thiol-bearing molecule removed with concomitant hemithioacetal formation equilibrium displacement towards the starting reactants, Figure 4.7) and Workup III (hemithioacetal intermediate amount reduced by pH increase) and the thioacetal form cannot be further increased by FD as compared to Workup II where both reacting species are present during FD. In fact, for Workup I and III, all observed thioacetals were mostly formed *in situ* during the 72 h reaction and results indicate that for reactions performed with 5 equivalents of thiol-bearing molecule per aldehyde, *in situ* stabilization into the thioacetal form is low.

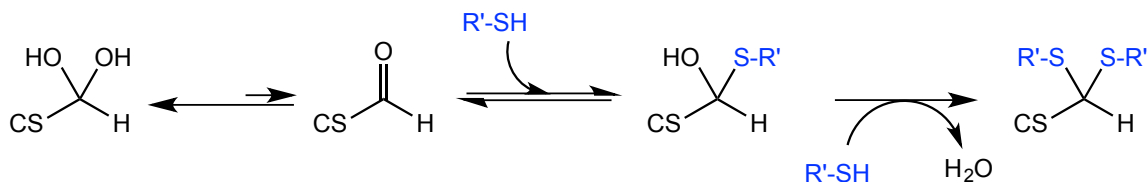


Figure 4.7 : Thiol addition to the aldehyde group of the M-Unit CS HCl salt under acidic aqueous conditions: despite the fact that the aldehyde is only present in trace amounts within the reaction

medium, the pH- dependent hemithioacetal intermediate formation equilibrium can be displaced by the intermediate stabilization into the corresponding thioacetal at low thiol concentration.

4.4.3.4 Hemithioacetal-to-thioacetal conversion within the reaction medium is increased by large excess of thiol equivalents

The conjugations implemented with 20 equivalents of thiol-bearing molecules per CS end unit revealed higher conversion rates ($F = 55\text{-}70\%$ at 50°C depending on the thiol-bearing molecules engaged) and were independent of the workup implemented (i.e. I and II, Table 4.2). These results also support the proposed reaction mechanism proposed in Figure 4.7. Indeed, at higher thiol concentrations, hemithioacetal intermediates and thioacetal are both favored within the reaction medium. However, in this case, FD had no significant impact on the conversion degree. Our results suggest that at high thiol concentration (20 equivalents per aldehyde) the amount of thiol-bearing molecules is sufficient to achieve significant hemithioacetal stabilization *in situ*. The fact that FD has no significant impact on the functionalization rate is unclear and would require additional investigations.

4.4.3.5 Temperature favors both hemithioacetal formation and stabilization to the thioacetal form

The highest conversion degrees were obtained at 50°C , regardless of the workup implemented (Table 4.2). Indeed, an increase in temperature favors the hemithioacetal intermediate formation by increasing the probability of thiol-bearing molecules to react with the CS HCl salt M-Unit aldehyde. Similarly, stabilization of the hemithioacetal intermediate occurred with an increase in temperature, favoring the second thiol model attack by increasing the probability of collisions between species. This mechanism is especially valid for the results corresponding to Workups I and III where no FD stabilization was reported. Indeed, the functionalization degree varied from 2 to 26% for BME and from 10 to 14% for MPA, for 25 and 50°C respectively. The proposed mechanism involving an equilibrium between the starting reactants and the hemithioacetal intermediate (Figure 4.7) is thus confirmed by this increase in conversion degree with temperature.

4.4.4 Effective CS PEGylation by thioacetylation of the CS M-Unit aldehyde

4.4.4.1 CS-b-PEG₂ block-copolymer synthesis

As a direct application of the thioacetylation conjugation developed in the paper herein, a 2 kDa mPEG-SH was reacted with a 10 kDa CS HCl salt. The choice of a 2 kDa PEG was based on the CS and PEG molecular weight (Mw) ratio (10 kDa and 2x2 kDa, respectively), expecting the PEG Mw to be large enough to form micellar structures (see section below). Because of solubility limitations with these longer chains, the reaction was performed at 5 mM aldehyde instead of 20 mM that was used for the reactions between the 2 kDa CS and MPA or BME. In order to counterbalance the decrease in aldehyde concentration, the reaction was performed at 50°C for 72 h and ten thiol equivalents per aldehyde were used. After direct FD of the reaction medium and unreacted mPEG-SH removal by multiple precipitations, ¹H NMR analysis of the final product (Figure 4.8) was performed and functionalization degree values (*F*) of 61 and 51% were found with Eqn (4) and (5) (where only the *gem*-diol peak integration decrease was considered), respectively.

The slight discrepancy between these two values could possibly be due to the presence of residual mPEG-SH post-purification. This hypothesis was confirmed by SEC analysis of the conjugates, where a small residual peak identified as mPEG-SS-PEGm was detected. Because PEG and CS molecular weights are close to each other, the DOSY NMR processing used to validate covalent conjugation of MPA and BME to CS was found to be inefficient for the block-copolymer (data not shown).

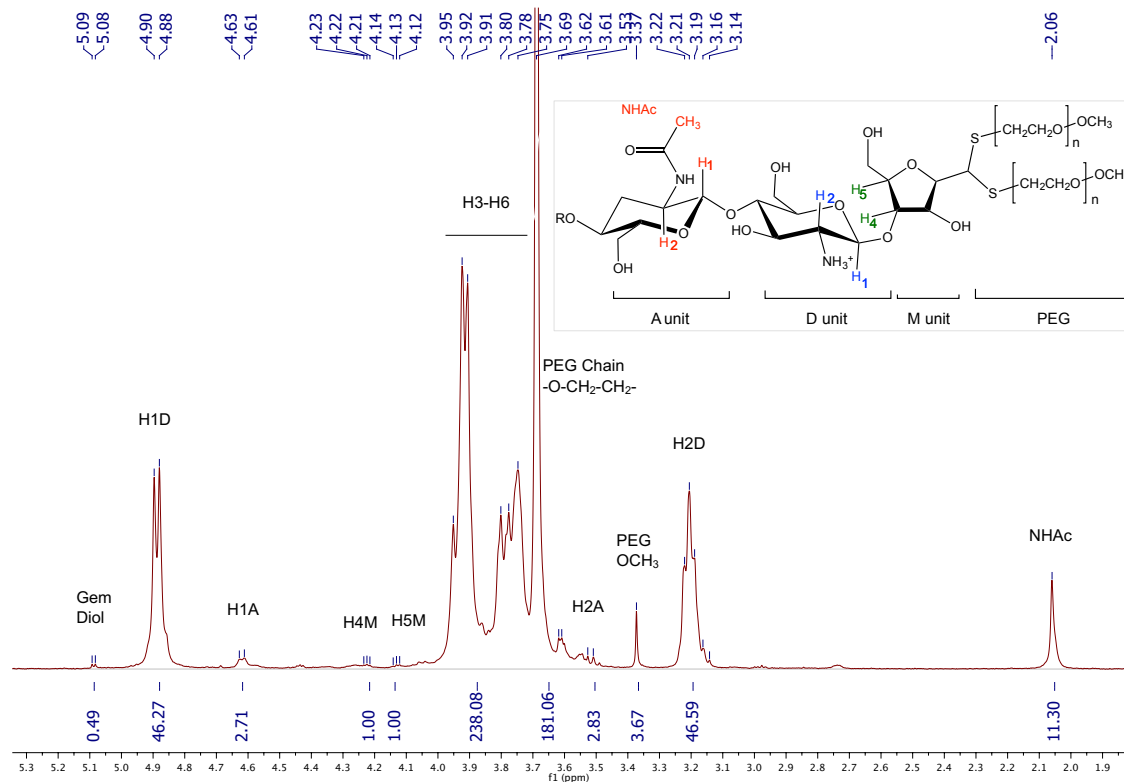


Figure 4.8 : ^1H NMR spectrum of the CS-b-PEG₂ block-copolymer after workup II (D_2O , $T = 70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6 s, acquisition time = 2 s, exponential apodization = 1 Hz). Integration of *gem*-diol proton peak was used to calculate the functionalization degree (in this particular case, $F = 51\%$ according to Eqn (5)).

4.4.4.2 CS-b-PEG₂ block-copolymer/pDNA polyplexes are homogeneously spherical

The CS-b-PEG₂ block-copolymer (CS 92-10 and 2 kDa mPEG-SH) synthesized above was used without further purification to form polyplexes with plasmid DNA (pEGFP_{Luc}). Whereas ESEM imaging of polyplexes prepared with unmodified CS revealed various morphologies, namely toroids, spheres and rods, those prepared with CS-b-PEG₂ block-copolymer were uniformly spherical (Figure 4.9).

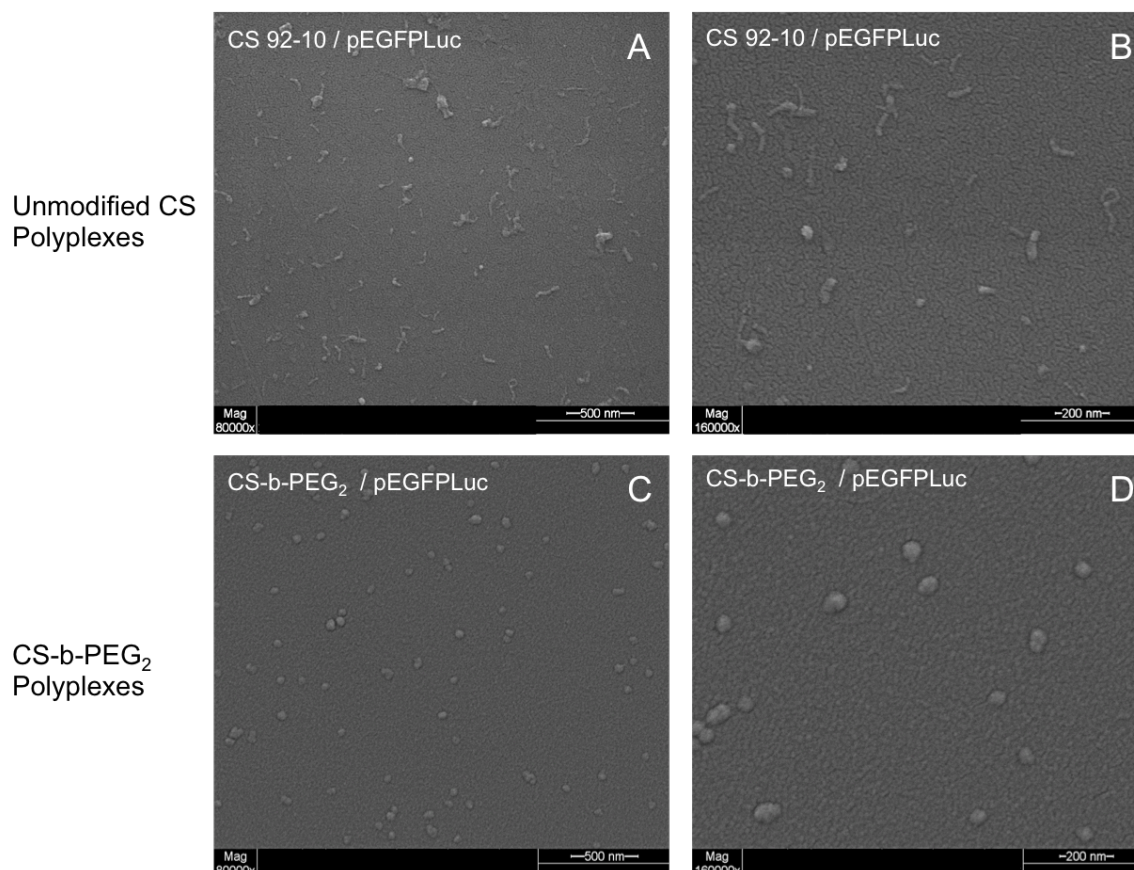


Figure 4.9 : Environmental scanning electron microscopy (ESEM) pictures (high vacuum mode, accelerating voltage = 20.0 kV; spot size = 3 and working distance = 5 mm) of polyplexes formed with pDNA and unmodified CS or CS-b-PEG₂ block-copolymer (amine to phosphate ratio = 3.7, N/P = 3.7). (A and B) (x80 000 and x160 000, respectively): polyplexes formed with CS 92-10 are heterogeneous in size and present various morphologies (globular, rod-like and toroidal). Pictures C and D (x80 000 and x160 000, respectively): polyplexes formed with CS-b-PEG₂ (CS 92-10 and mPEG-SH 2 kDa), are uniformly spherical.

The structure modification of the polyplexes formed with PEGylated CS was also confirmed by DLS, where the measured Z-average diameters decreased from 106 (\pm 1) to 76 (\pm 1) nm, for the unmodified CS and CS-b-PEG₂ block-copolymer, respectively (Table 4.3).

Table 4.3 : DLS measurements of unmodified CS and CS-*b*-PEG₂ polyplexes prepared with pDNA (pEGFP_{Luc}, N/P = 3.7). Samples were analyzed in duplicate ($N=2$, $\pm(\text{max-min})/2$). The size of CS-*b*-PEG₂ polyplexes is smaller as compared to native polyplexes.

Samples	Z-Average diameter/nm	PDI
Unmodified CS polyplexes	106 (± 8)	0.19 (± 0.00)
CS- <i>b</i> -PEG ₂ polyplexes	76 (± 5)	0.23 (± 0.02)

Since the PEGylated polyplexes are uniformly spherical and show a narrower size as compared to those prepared with corresponding homopolyions, these observations are consistent with the formation of micellar structures called “Block Ionomer Complexes” (BICs) (Kabanov, A. V. & Kabanov, 1995; Voets *et al.*, 2009; Pergushov *et al.*, 2012).

4.5 Conclusions

This study revealed that the aldehyde present on chitosan mannose (M-Unit) end-group is displaced completely towards its hydrated and unreactive form (*gem*-diol) in aqueous conditions. The ubiquity of the unreactive *gem*-diol form in aqueous conditions revealed by ^1H NMR (dehydrated reactive form not detected) could be due to both H-bonding and hydration effects. Despite the fact that the aldehyde reactive moiety is only present in trace amounts, the development and optimization of a thiol-based chemistry allowed efficient conjugation to the CS terminal M-Unit in aqueous conditions ($F = 55\text{--}70\%$ depending on the thiol-bearing molecule). A combination of mass spectrometry and NMR analyses revealed that two thiol-bearing molecules react regioselectively with the terminal aldehyde of the polymer to form a thioacetal. The stabilization of the hemithioacetal intermediate was found to be facilitated by freeze-drying (Figure 4.10).

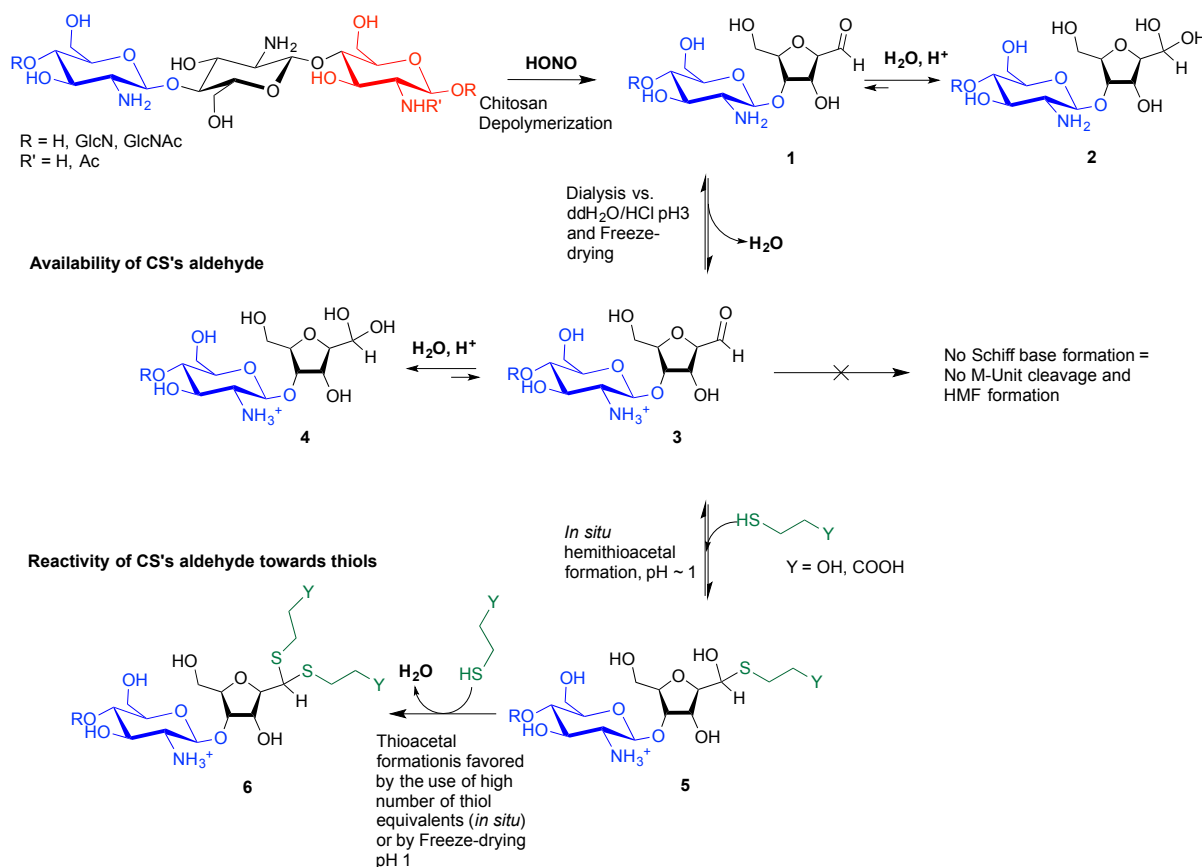


Figure 4.10 : Summary of mechanisms elucidated in this study for thiol-based end-group derivatization of chitosans: CS nitrous acid depolymerization induces the formation of M-Unit that

carries an aldehyde moiety at the end of the cleaved polymer (1). The equilibrium between the M-Unit aldehyde and its hydrated form (*gem*-diol) is strongly displaced towards the latter (2). If the CS depolymerization medium is freeze-dried at pH well below the CS pKa (i.e. pH ~3-4 or below), all the CS amines are protonated and are therefore unable to react with any aldehyde group, maintaining the CS M-Unit integrity at the end of the cleaved polymer (3). Nevertheless, the equilibrium between the M-Unit aldehyde and the corresponding *gem*-diol is still displaced towards the hydrated form (4). Despite the undetectable aldehyde moieties, thiol molecules and the M-Unit CS aldehyde are engaged in a pH-dependent equilibrium with the corresponding hemithioacetal intermediate (5). The stabilization of the latter into its thioacetal form (6) occurs either by increasing the amount of thiol-bearing reactants in the medium (*in situ* stabilization), or by freeze-drying the reaction medium when low amounts of thiol are engaged.

As a direct application of this novel conjugation strategy, a CS-b-PEG₂ block-copolymer was successfully synthesized by thioacetylation of the CS 92-10 M-Unit aldehyde with a 2 kDa mPEG-SH. This block-copolymer was used to prepare polyplexes with pDNA that were found to be uniformly spherical and more homogeneous as compared to those prepared with native CS.

The new CS end-group thioacetylation process that was developed in this study presents several advantages in comparison to the oxime-click method developed previously (Benediktsdottir *et al.*, 2012; McManus, 2012; Novoa-Carballal & Muller, 2012). That is (1) it can be used for CS derivatization without interfering with amine groups that are fully protonated and thus unreactive, (2) it is efficient in aqueous media, and (3) there is no need for an external chemical treatment to stabilize the adducts. It is worth mentioning that the stabilization of the hemithioacetal intermediate by a second nucleophilic attack could be sterically hindered by the presence of the first external group for large thiol-bearing substituents. In order to circumvent this issue and to further improve the conjugation efficiency, studies are ongoing where a molecule bearing two thiol groups (a thiol-based “hook”) is used for conjugation to the CS M-Unit. The presence of two thiol moieties along with their adequate positioning on the molecule to be conjugated may allow for an intramolecular stabilization of the hemithioacetal, which is expected to rule out any steric hindrance issues and to occur *in situ* at significantly lower thiol concentrations vs. the intermolecular stabilization studied herein.

CS end-group modifications such as PEGylation and the formation of other types of block-copolymers as well as CS grafting onto surfaces via a single covalent bond are a few applications of our proposed green chemistry protocol. These could be advantageously applied to various

biomedical research fields including gene delivery and tissue engineering. Additionally, we expect this thiol-based chemistry to be applicable to other polymers bearing aldehydes or ketones.

4.6 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and ANRis Pharmaceuticals. The authors would like to acknowledge Monica Iliescu Nelea (Polytechnique Montréal), Alexandra Furtos (Université de Montréal) and Cédric Malveau (Université de Montréal) for the ESEM pictures and helpful discussions on mass spectrometry and NMR spectroscopy, respectively.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : REGIOSELECTIVE CHITOSAN END-GROUP ACTIVATION: THE TRISKELION APPROACH

Pickenhahn, V. D., Grange, M., De Crescenzo, G., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2016). Regioselective Chitosan End-Group Activation : The Triskelion Approach. Soumis à *Chemical Science*.

5.1 Abstract

Chitosan (CS) end-group conjugation methods are rarely reported in the literature, mainly since the CS terminal aldehyde moiety produced by nitrous acid depolymerization is only present in trace amounts in its reactive form. In a previous study, our group proposed an intermolecular thioacetylation process that allowed terminal conjugation of thiol-reactive species to chitosan with 50% efficiency. However, this reaction is incompatible with acid-labile substituents and the conversion efficiency of CS end-groups could be limited by the size of the thiol-reactive species engaged in the reaction, mainly by steric hindrance since two substituents are required to obtain the stabilized thioacetal derivative. In the present study, we developed a novel CS end-group thioacetylation approach relying on a new regioselective linker that bears three thiol moieties. This trivalent linker, referred to as Triskelion here, was specifically designed for activation of CS 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) end-group and consists of a thiol-hook for efficient aldehyde conjugation through an intramolecular reaction and a thiol-tail that remains available for subsequent end-group functionalization with any thiol-reactive species. The chemical synthesis of this linker provided the desired material with high yields over three steps. The *in situ* intramolecular thioacetylation process between the Triskelion linker and 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit, monomeric) was assessed by semi-quantitative LC-MS studies, revealing that the corresponding intramolecular thioacetal largely predominated (~90%). This regioselective derivatization was also performed onto M-Unit CS aldehydes and the desired CS-b-Triskelion conjugates were obtained with functionalization degrees over 85%, as confirmed by NMR spectroscopy (^1H and DOSY). As a final assessment of the CS-b-Triskelion thiol-tail reactivity, these conjugates were successfully engaged with thiol-reactive magnetic beads into disulfide bond displacement with 50% efficiency. The proposed CS terminal activation with the Triskelion linker opens new perspectives for

biomedical applications, especially brush-like surface modifications and other copolymers formation through disulfide linkages or Michael-type additions.

5.2 Introduction

Chitosan (CS) and its derivatives hold great interest for biomedical applications in regenerative medicine (Shi *et al.*, 2006), tissue engineering (Dutta *et al.*, 2011; Croisier & Jérôme, 2013; Levensgood & Zhang, 2014) and drug/gene delivery (Dash *et al.*, 2011; Buschmann *et al.*, 2013; Hu, L. *et al.*, 2013) fields. CS graft-modifications located on the C-2 amines and/or the O-6 hydroxyls along the CS backbone, such as in polymer conjugation (Park *et al.*, 2001; Germershaus *et al.*, 2008), ligands/fluorescent dye addition (You *et al.*, 2007; Na *et al.*, 2011; Prichystalova *et al.*, 2014; Upadhyaya *et al.*, 2014) have been proposed in order to provide the biopolymer with new/enhanced properties, for various drug/gene delivery (Liu, Z. *et al.*, 2010; Casettari & Illum, 2014; Sarvaiya & Agrawal, 2015), imaging (Fei & Gu, 2009) and tissue engineering (Larsson *et al.*, 2013; LogithKumar *et al.*, 2016) applications. However, such lateral grafting may negatively impact on the ability of CS to bind anionic components such as nucleic acid, either by reducing its positive charge (N-grafts) or by steric hindrance (for N/O-grafts copolymers) (Casettari *et al.*, 2012). Moreover, given that many reactive moieties are available along the CS backbone, obtaining graft-conjugates that are structurally well-defined may prove challenging (Casettari *et al.*, 2012; McManus, 2012). Block-copolymerization is a promising approach when compared to lateral grafting methods, not only because it circumvents the aforementioned issues, but also because it allows for the synthesis of chitosan derivatives with distinct and unique properties and applications (e.g. polymeric micelles formation, brush-like surface modification).

The production of chitosan-based copolymers through end-group modifications such as fluorophore conjugation and PEGylation relying on oxime-click chemistry has been reported (Benediktsdottir *et al.*, 2012; Novoa-Carballal & Muller, 2012; Novoa-Carballal *et al.*, 2014). As an alternative strategy for CS-based block copolymers synthesis, we recently developed an aqueous thiol-based chemistry approach, namely thioacetylation (Figure 5.1 – Part A) (Pickenhahn *et al.*, 2015). The aldehyde functions present on CS termini following nitrous acid (HONO) depolymerisation (Allan & Peyron, 1995a) were regioselectively modified in acidic aqueous conditions with linear thiol bearing molecules, without any interference from C2-amines and C6-hydroxyl CS moieties. Despite the fact that the CS end-group aldehyde reactive form is only present in trace amounts (the non-reactive *gem*-diol form largely predominates in aqueous conditions), thiol bearing polymers such as PEG-thiols were conjugated to the CS end group with an efficiency

close to 50%. The CS end-group thioacetylation presents significant advantages compared to the alternative oxime-click pathway: 1) CS derivatization is effective in acidic aqueous conditions so that any interference with CS amine groups that are fully protonated and thus unreactive (Filion *et al.*, 2007) is prevented and 2) there is no need for an external chemical treatment to stabilize the final structure (Zatsepin *et al.*, 2002). The aqueous thioacetylation process occurs with a first thiol attack on the CS aldehyde end-group that forms a hemithioacetal intermediate (Figure 5.1 – structure 1) that must be subsequently stabilized *in situ* by a second thiol nucleophilic attack, the latter being facilitated by concentrating the reaction medium through a freeze-drying (FD) process (Figure 5.1 – structure 2). Indeed, FD was shown to substantially increase the conversion degree of this transformation, especially for cases where thiol-molecules were used in slight to moderate excess *vs.* chitosan end-groups.

It is worth mentioning that the intermolecular stabilization of the hemithioacetal intermediate may be sterically hindered by the presence of the first reacted group for large thiol-bearing substituents, potentially limiting the conjugation efficiency. Additionally, although the need to use strong acidic conditions for this thioacetylation process to be effective also ensures the regioselectivity of the reaction by protonating all CS amines, it may nevertheless compromise the integrity of moieties to be conjugated.

The main objective of this study, depicted in Figure 5.1 – Part B, was to develop an innovative and improved CS end-group thioacetylation process that would address the shortcomings mentioned above and allow for the effective terminal activation of the polymer and its subsequent conjugation with any thiol reactive structure. In order to achieve this goal, we designed and synthesized a trivalent linker, referred to in this manuscript as “Triskelion”, which bears three thiol moieties (Figure 5.1 – structure 3). We hypothesized that this specific trivalent structure would provide the linker with the following characteristics: 1) on one side, two thiol moieties forming a thiol-hook should allow for the two thiol attacks onto the CS reducing-end required for stabilization to occur almost simultaneously (intramolecular *vs.* intermolecular thioacetylation; Figure 5.1 – structure 4) and therefore significantly improve the conjugation efficiency, while 2) the other extremity of the linker carrying the third thiol moiety, referred to as the thiol-tail, should allow for subsequent functionalization in mild conditions with any structure bearing a thiol-reactive moiety (Figure 5.1 – structure 5).

The effectiveness and the regioselectivity of the condensation reaction between the Triskelion linker and 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit), the CS terminal monomer unit bearing an aldehyde function following HONO depolymerisation, were examined by Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS). For comparison purpose, a small molecule bearing a similar thiol-hook, namely ethanedithiol (EDT), was also reacted with the M-Unit. These mechanistic studies were followed by quantitative experiments where HONO depolymerized CS bearing an M-Unit end was conjugated with the Triskelion linker and EDT. The conjugation efficiency was determined by ^1H NMR spectroscopy. Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) experiments were also performed to assess the covalent conjugation in order to prevent physical mixture of reagents. Finally, reactions between Triskelion-modified CS and microparticles coated with pyridyl disulfide moieties were performed as a direct application of this novel conjugation strategy.

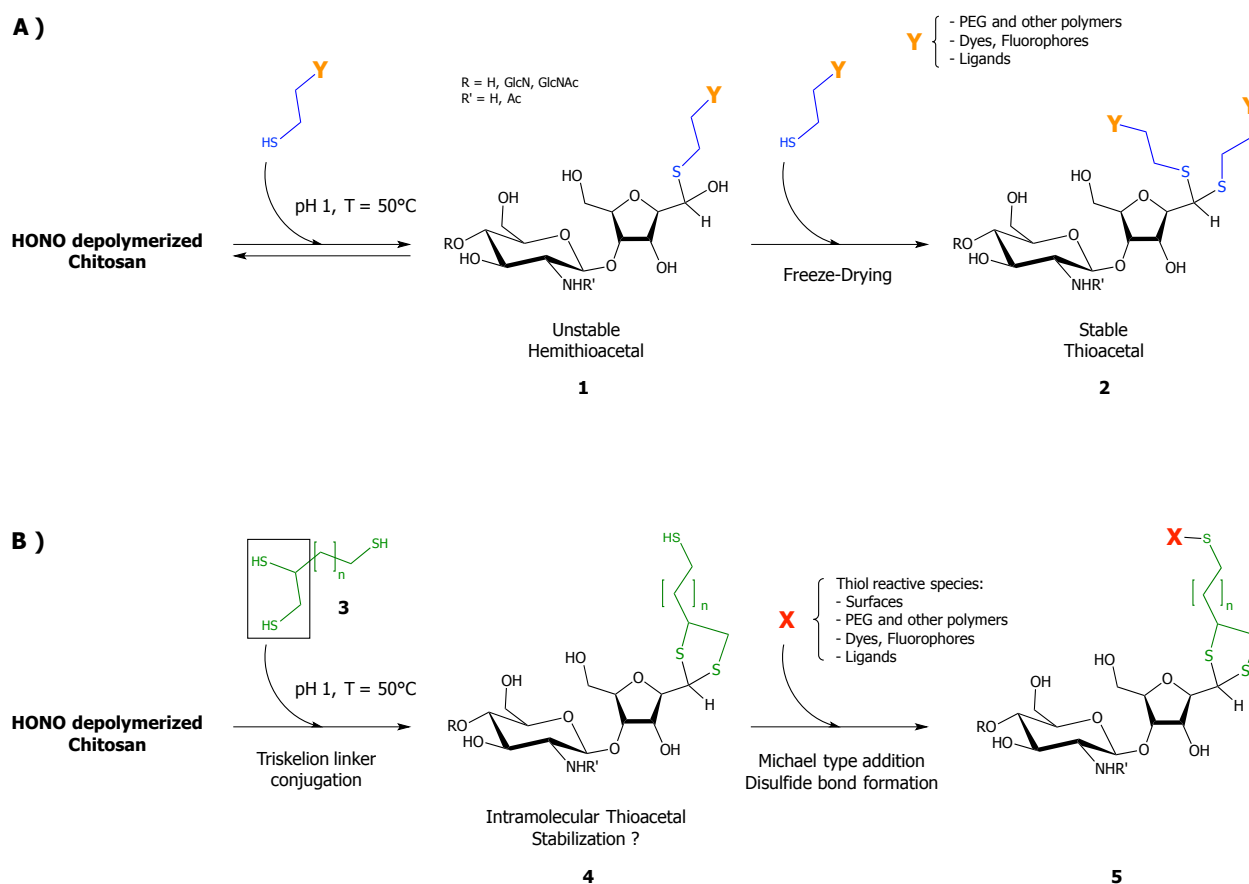


Figure 5.1 : Schematic representation of the CS end-group thioacetylation processes developed by our group: A) Summary of the previously described chitosan end-group thioacetylation process (Pickenhahn *et al.*, 2015). Briefly, CS nitrous acid (HONO) depolymerization induces the

formation of 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) that carries an aldehyde moiety at the end of the cleaved polymer. Despite the fact that this aldehyde is present almost completely in its hydrated and non-reactive form (gem-diol), thiolated macromolecules react with it in strong acidic conditions (pH 1) through a pH dependent equilibrium, forming the corresponding hemithioacetal intermediate (structure **1**). The stabilization of the latter into its thioacetal form (structure **2**) occurs with a second thiolated macromolecule attack on the same location, an attack that may be sterically hindered by the presence of the first macromolecule. B) The novel HONO-depolymerized CS end-group thioacetylation process. The trivalent linker (structure **3**), referred to as Triskelion, comprises a thiol-hook (framed) and a thiol-tail. The derivatization of CS end-groups with Triskelion should predominantly lead to the formation of structure **4** by promoting the thiol-hook attack on the CS aldehyde through a facilitated and more efficient intramolecular thioacetylation process *vs.* the previously described intermolecular strategy (Pickenhahn *et al.*, 2015). The terminally-activated CS (i.e. the CS-b-Triskelion adduct) can freely react with any thiol-reactive species or structure through its remaining thiol-tail, as represented in structure **5**.

5.3 Materials and methods

Each chemical reaction was performed at least three times independently ($N \geq 3$), using fresh reactants in Ar degassed solvents to minimize disulfide bond formation.

5.3.1 Reagents, Materials

Chitosan with a degree of deacetylation (%DDA) of 91.7%, $M_n=193$ kg.mol⁻¹ (PDI=1.256) was provided by Marinard Biotech Inc. Deuterium oxide (Cat #151882), Deuterium chloride 35 wt. % in deuterium oxide (Cat #543047), Chloroform-d (Cat #151858), Sodium nitrite (Cat #431605), Hydrochloric acid standard solution - 1.0 N in H₂O (Cat #31,894-9), Hydrochloric acid 37% (Cat #320331), Sodium hydroxide solution 1.0M (Cat #319511), Sodium acetate (Cat #241245), GlcNH₂ D-(+)-Glucosamine hydrochloride 99% (Cat #C-1276), Sodium acetate trihydrate BioXtra (Cat #S7670), Dowex[®] 50WX8-100 [H⁺] (Cat #217506), Dowex[®] 1X8-50 [Cl⁻] (Cat #217417), EDT (1,2-Ethanedithiol) $\geq 98.0\%$ (Cat #02390), 2-Propanol anhydrous 99.5% (Cat #278475), 1,2,6-Hexanetriol 96% (Cat #T66206), Methanesulfonyl chloride $\geq 99.7\%$ (Cat #471259), Potassium thioacetate 98% (Cat #241776), Dichloromethane anhydrous $\geq 99.8\%$ (Cat #270997), Tetrahydrofuran anhydrous (Cat #186562), Triethylamine BioUltra $\geq 99.5\%$ (Cat #90335), Sodium carbonate BioXtra $\geq 99.0\%$ (Cat #S7795), Sodium chloride BioXtra $\geq 99.5\%$ (Cat #S7653), Magnesium sulfate anhydrous *ReagentPlus*[®] $\geq 99.5\%$ (Cat #M7506), Ethyl acetate CHROMASOLV[®] for HPLC $\geq 99.8\%$ (Cat #439169), Cyclohexane for HPLC $\geq 99.9\%$ (Cat #650455), N,N-Dimethylformamide biotech. grade, $\geq 99.9\%$ (Cat #494488), Sodium methoxide 0.5 M in methanol (Cat #71751), Methanol for HPLC, $\geq 99.9\%$ (Cat #34860), Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride BioUltra, $\geq 98\%$ (Cat #75259) were purchased from Sigma-Aldrich. Macrosep Advance Centrifugal Devices with 1kDa MWCO Omega Membrane (Cat #MAP001C37), Fluorescein-5-maleimide (Cat #16383) and Thiol-Activated MagBeads (Cat #50605) were purchased from Pall Corporation, Cayman Chemical and PureCube, respectively.

5.3.2 Trivalent linker – Triskelion synthesis

As starting material, the commercially available 1,2,6-hexanetriol (Figure 5.2 – structure 1) has been chosen because of its potential to form a stable 5-membered thioacetal ring once conjugated to the aldehyde carried by the CS terminal 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) (Pihlaja & Pasanen,

1981; Satchell & Satchell, 1990) (Figure 5.1 – structure 4). The triol starting material also comprises a “thiol-tail”, a spacer composed of 6 bonds that is likely to provide sufficient flexibility and mobility to the third remaining thiol group in order to minimize steric hindrance effects and facilitate subsequent CS-Triskelion conjugation reactions (Goddard & Hotchkiss, 2007; Delaittre *et al.*, 2012).

As depicted in Figure 5.2, the triol starting material (Figure 5.2 – structure 1) was engaged in a 3-step synthesis inspired from Van der Vlies *et al.* (van der Vlies *et al.*, 2012) where hydroxyls were transformed into mesylate (-OMs) leaving groups (Figure 5.2 – structure 2). The mesylates were then displaced by sodium thioacetate (-SAc) and the acetate protected Triskelion linker (Figure 5.2 – structure 3) was deprotected with sodium methoxide (MeONa) to obtain the desired trithiol linker (Figure 5.2 – structure 4), namely the Triskelion. The detailed protocols of the Triskelion synthesis and characterization (^1H , ^{13}C NMR spectroscopy and Mass spectrometry) are available in Supp. Info.; Annexe C – Section 1.

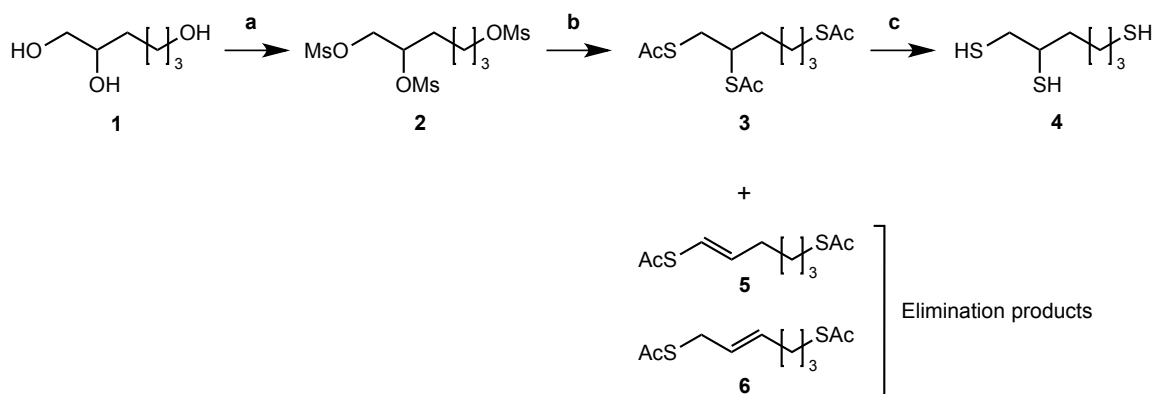


Figure 5.2 : Schematic representation of the Triskelion synthesis pathway. The triol starting material, namely 1,2,6-hexanetriol (**1**), was activated with methanesulfonyl chloride (MsCl) (**2**) in an anhydrous 2:1 mixture of dichloromethane (DCM) and tetrahydrofuran (THF) (**a**). Mesylate leaving groups (-OMs) were displaced by potassium thioacetate (AcSK) in anhydrous dimethylformamide (DMF) (**b**) to give the acetyl-protected Triskelion linker (**3**) as major product. The cleavage of acetyl groups was performed using sodium methoxide (MeONa) (**c**) in order to obtain the desired Triskelion linker (**4**) in high yields (66% over 3 steps). Compounds (**5**) and (**6**) correspond to the elimination products obtained after mesylate group displacement. The detailed synthesis protocols are available in Supp. Info.; Annexe C – Section 1. Summary of conditions: (**a**) MsCl in anhydrous [2:1] DCM/THF at room temperature for 3h; (**b**) AcSK in anhydrous DMF at 0-5°C overnight; (**c**) MeONa in MeOH at room temperature for 5-10 min.

5.3.3 Intramolecular thioacetylation of CS end-group studies involving molecules bearing a thiol-hook

With the Triskelion linker synthesized, the conjugation process with 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) and CS M-Unit aldehyde was assessed semi-quantitatively and then quantitatively, using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (^1H and DOSY NMR) experiments, respectively. The experimental flowchart of these experiments is presented in Figure 5.3.

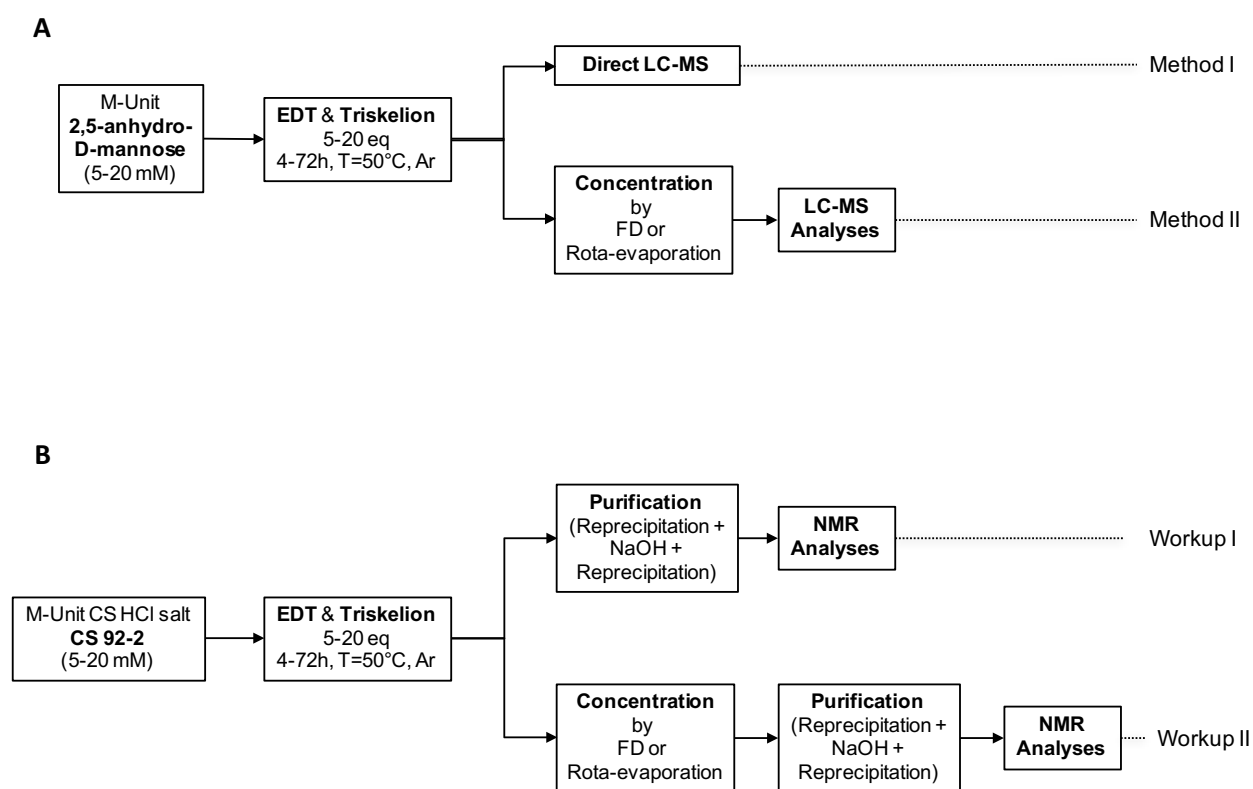


Figure 5.3 : Experimental design flowchart. (A) Mechanistic studies. M-Unit (2,5-anhydro-D-mannose) obtained by HONO treatment of glucosamine, was reacted with molecules bearing a thiol-hook (Ethanedithiol -EDT- and Triskelion linker). The products of these reactions were treated using either Method I: Direct LC-MS of the reaction mixture to determine to which extent intramolecular thioacetal formation occurs in situ or Method II: Concentration prior to perform LC-MS analysis to determine the influence of such dehydration/concentration step on the final products proportion and also to detect some by-products formation upon concentration). (B) M-Unit CS HCl salt reactivity. M-Unit CS HCl salt was also reacted with Ethanedithiol -EDT- and Triskelion linkers. After reaction completion, reaction media were treated using either: Workup I: Unreacted thiol-hook molecules removal by reprecipitation + NaOH treatment + reprecipitation in

order to determine the in situ conjugation process efficiency or Workup II: Concentration by FD or rota-evaporation + Workup I in order to quantify a potential increase in conjugation efficiency upon concentration. Conjugation process efficiencies were determined by ^1H NMR using both Equations 1 & 2 as detailed in the section below.

5.3.3.1 Qualitative evaluation of the 2,5-anhydro-D-mannose – molecules bearing a thiol-hook conjugation by LCMS (Figure 5.3 – Part A)

5.3.3.1.1 2,5-anhydro-D-mannose derivatization

The M-Unit (CS 2,5-anhydro-D-mannose) was synthesized by adapting Claustre *et al.* protocol (Claustre *et al.*, 1999) and then derivatized with 5-20 equivalents of molecules bearing a thiol-hook (Ethanedithiol –EDT- and Triskelion linker). The detailed protocols of this transformation, as well as the complete characterization of the final products are available in Supp. Info.; Annexe C – Section 2.1; Briefly, the previously described thioacetylation conditions were used (10-20 mM M-Unit aldehyde at pH 1, 4-72h at 50°C (Pickenhahn *et al.*, 2015)), except that a co-solvent addition was required to solubilize the EDT and the Triskelion within the reaction media. The nature of the co-solvent (isopropanol, methanol or tetrahydrofurane) as well as its relative proportion within the reaction mixture depended on the hydrophobicity of the thiol-hook linker engaged in the reaction. Thus EDT was conjugated in 30% isopropanol, co-solvent that was changed for 30% THF and 90% MeOH for derivatization with Triskelion, the initial mixture being not sufficiently hydrophobic to solubilize the trivalent linker. After completion of the conjugation process, the reaction mixture was split into 2 parts and was processed according to Method I and Method II: Method I corresponds to the direct LC-MS analysis of the reaction medium in order to determine the thioacetal proportion that was formed *in situ*, whereas Method II corresponds to freeze-drying (FD) or concentration to dryness prior to LC-MS analysis. This concentration step prior to analysis was included since freeze-drying was demonstrated to improve the thioacetylation reaction efficiency in our previous study (Pickenhahn *et al.*, 2015).

5.3.3.1.2 LC-MS analyses of the derivatization products

Liquid chromatography - mass spectrometry (LC-MS) data were acquired on an Agilent 6224 LC-TOF mass spectrometer in positive electrospray ion mode, coupled to an Agilent 1260 series liquid chromatography system (Agilent Technologies) equipped with a XSELECT CSH™ C18 column

(4.6 x 100mm, 5 μ m particles) from Waters. The eluents consisted of 0.1% formic acid in water (eluent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (eluent B). The initial mobile phase contained 1% eluent B and was increased from 1 % to 80 % in 1 min at 0.5 mL/min and then held for 4 min at 80 %. The system was returned to the initial conditions at 5.2 min and was held constant for up to 10 min to allow column equilibration. Mass spectra were acquired for m/z ranging from 50 to 1200 and the corresponding data were processed with the Mass Hunter B.06 software (Agilent Technologies).

The expected derivatized M-Unit products were analyzed by comparing the chromatogram integration peaks of determined m/z values corresponding to both proton and sodium adducts within the same run. Such an approximation was deemed appropriate given that potential products (Figure 5.7) have similar structures and are therefore expected to have nearly equal sensitivity to ionization.

5.3.3.2 Quantitative evaluation of the M-Unit CS aldehyde – thiol-hook molecules conjugation by NMR (Figure 5.3 – Part B)

5.3.3.2.1 M-Unit CS 92-2 HCl salt derivatization

As previously described (Pickenhahn *et al.*, 2015), Chitosan (CS; 92% DDA, Mn = 200 kDa) was depolymerized with nitrous acid (HONO), dialyzed vs. 1mM HCl and freeze-dried to obtain a 2-4 kDa M-Unit CS under its hydrochloride salt form. The short CS length of 2-4 kDa was chosen to facilitate the characterization of the final conjugates by NMR spectroscopy. CS was kept in its hydrochloride salt form in order to avoid any M-Unit cleavage. M-Unit CS HCl salts were reacted with molecules bearing a thiol-hook as described above for 2,5-anhydro-D-mannose. After reaction completion, reaction media were treated using two workups. Workup I consisted of reprecipitations in isopropanol (iPrOH) or in tetrahydrofuran (THF; in order to discard unreacted thiol-hook molecules) followed by an alkali treatment (in order to discard all unstable hemithioacetal intermediates (Barnett & Jencks, 1967) and quantifying the thioacetal structures only). Another reprecipitation step followed by FD was performed in order to obtain high purity conjugates that were formed *in situ*. In Workup II, the reaction medium was concentrated either by FD or rota-evaporation (to dryness) prior to performing the same purification process as that of Workup I. As previously mentioned, such concentration step prior to purification is expected to increase the conjugation efficiency (Pickenhahn *et al.*, 2015).

5.3.3.2.2 Quantification of CS derivatization efficiency: Functionalization degree calculation of non-purified modified CSs

Characterization of chitosan starting materials (DDA and Mn) as well as conjugation efficiencies were performed by ^1H NMR spectroscopy using a Bruker Avance III 400 spectrometer equipped with a Bruker CryoProbe Prodigy™. For optimal quantification accuracy, a pulse angle of 30° coupled to an acquisition time of 2 s and repetition times of 5-10 s were used, depending on the sample analyzed. Diffusion ordered spectroscopy experiments (DOSY) were used to assess the covalent conjugation and were performed on the same instrument, using 16 gradients (2.5 – 50.0 gauss/cm) with a gradient pulse (d) of 3 ms and a diffusion time (D) of 150 ms.

The regioselectivity as well as the stoichiometry of the thioacetylation process in acidic aqueous medium has been described by our group in a previous study (Pickenhahn *et al.*, 2015). Briefly, in the case of independent linear molecules bearing a single thiol moiety, two successive thiol attacks on the CS end-group aldehyde are required to stabilize the hemithioacetal intermediate into the thioacetal final product. In the case where molecules bearing a thiol-hook are reacted with M-Unit CS aldehyde in similar conditions, both thiol attacks are expected to occur intramolecularly and almost simultaneously, leading to the formation of a stable 5-membered ring thioacetal (Figure 5.1 – structure 4). As a consequence, we used the previously described equations by considering one thiol-hook molecule per aldehyde for the following calculations:

The functionalization degree (F) of each regioselective conjugation was assessed by ^1H NMR and calculated according to the following equations:

$$F = \frac{\frac{1}{\alpha} \sum \int H_{\text{Thiol peaks}}}{\frac{1}{2} \sum \int (H_4M + H_5M)} \times 100$$

Equation 1

$$F = \frac{\frac{1}{2} \sum \int (H_4M + H_5M) - \int H_{\text{Gem-Diol}}}{\frac{1}{2} \sum \int (H_4M + H_5M)} \times 100$$

Equation 2

Since M-Unit corresponds to the CS chain extremity, both equations were normalized using its characteristic peaks, namely H_4M & H_5M (Figure 5.4). Equation 1 involves the integration of the

conjugated linker characteristic peaks only ($H_{Thiol\ peaks}$), whereas Equation 2 is based on the diminution of the gem-diol peak intensity ($H_{Gem-Diol}$); $H_{Gem-Diol}$ representing the proportion of unmodified CS end-groups (Tømmerraas, K *et al.*, 2001). Both integrations in Equation 1 and Equation 2 are normalized to the number of protons used for the calculation, namely $\alpha = 4$ for EDT derivatized products and $\alpha = 6$ for Triskelion's $\alpha = 1$ and 2 for the *gem*-diol and M-Unit (H_4M & H_5M), respectively (Figure 5.4). It is worth mentioning that the stoichiometry (and the regioselectivity) of the transformation can be validated by comparing the results of these two equations. Indeed, given that Equation 2 is independent from reaction stoichiometry, it will be consistent with Equation 1 result only if the stoichiometry chosen for calculation in Equation 1 is correct, namely one thiol-hook per CS terminal unit.

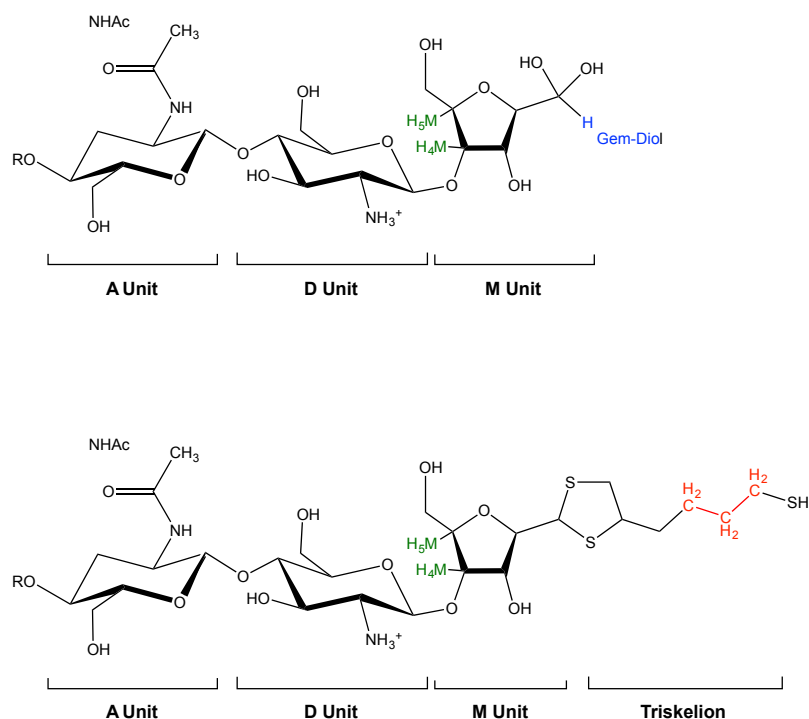


Figure 5.4 : Structure of unmodified CS (top) and CS-b-Triskelion adduct (bottom). The protons corresponding to the 1H NMR peaks used for the calculations of the functionalization degree in Equations 1 and 2 are shown in green, blue and red.

5.3.4 CS-b-Triskelion conjugation to magnetic microparticles

CS-b-Triskelion conjugates synthesized as described above were engaged with pyridyl disulfide-activated magnetic beads in order to assess the thiol-tail reactivity of such conjugates towards thiol-reactive species through disulfide bond displacement (Figure 5.5). Briefly, a reduced CS-b-Triskelion mixture in 50 mM acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl ($m = 10$ mg, $F = 70\%$, $n_{SH} = 3$ μmol , $c = 10$ mg.mL^{-1}) was incubated with thiol-activated magnetic beads ($v = 1$ mL, 1.5 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$ functional group density) for 24h under inert atmosphere at room temperature. The efficiency of the conjugation process was assessed by measuring the absorbance of the 2-thiopyridone group released upon disulfide linkage displacement ($\lambda = 343\text{nm}$, $\varepsilon = 7175$ $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ in the conjugation buffer). The selectivity of the approach was examined using a negative control by engaging non-modified CS with freshly activated beads. The concentration of non-modified CS within the supernatant of the conjugation medium was measured using the spectrophotometric Orange II assay (Ma *et al.*, 2010). The selectivity of the conjugation reaction was also assessed by ^1H NMR analyses and by comparing the functionalization degree (F) of the CS that was released from the beads surface after careful removal of unreacted CS to that of the original mixture engaged in the conjugation process. The detailed protocol of this transformation and associated analyses are provided in Supp. Info.; Annexe C – Section 4.

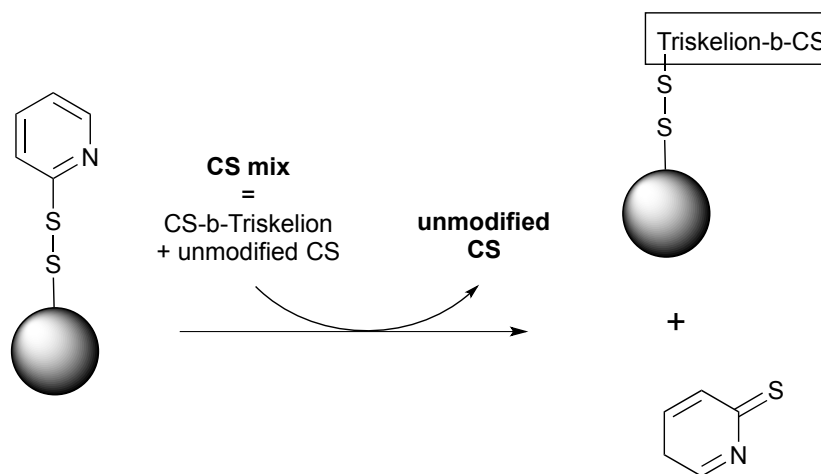


Figure 5.5 : Schematic representation of thiol-activated magnetic beads surface modification. CS-b-Triskelion was attached to thiol-activated magnetic microparticles through pyridyl disulfide bond displacement with the release of the pyridinethione leaving group.

5.4 Results and discussion

5.4.1 The pure trivalent linker was efficiently synthesized in 3 steps

The complete synthesis pathway depicted in Figure 5.2 representing the 3-step synthesis of the trivalent linker, namely Triskelion, is discussed in the following section.

The first step of the synthesis dealt with the functionalization of the triol hydroxyl group into leaving groups, namely mesylate groups. Methanesulfonyl chloride (MsCl) was preferred to its *p*-toluenesulfonyl chloride counterpart because it is less bulky and thus favors the transformation of the sterically hindered secondary alcohol while ensuring higher stability of the –OMs intermediates (Crossland & Servis, 1970). Since the triol starting material is not soluble in dichloromethane (DCM), it was dissolved in a [2:1] anhydrous mixture of dichloromethane / tetrahydrofuran (THF) to ensure complete solubility of the species engaged, namely 1,2,6-hexanetriol, methanesulfonyl chloride and triethylamine. Three equivalents of MsCl per hydroxyl moiety were used to avoid side reactions (-OMs group displacement by unreacted hydroxyls) and were also preferred to the 5 equivalents initially tested, as the amount of salts was too important with the latter and lowered the reaction medium stirring efficiency. The reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC) and ¹H NMR (Data not shown) and was complete in 3h at room temperature. Acidic workup was performed twice to get rid of salts that formed during the process. The tri-OMs intermediate (Figure 5.6 – Step 1) was pure enough to be engaged in the next step without further purification (Yield ≥ 93%, *F*=100% for all experiments; *N* = 4).

The second step of the synthesis is the displacement of the mesylate leaving groups by sodium thioacetate (AcSK; 5 equivalents per -OMs), a reaction favored in anhydrous dimethylformamide (DMF), a polar aprotic solvent (van der Vlies *et al.*, 2012). Initial attempts performed at room temperature revealed a [1:1] mixture of both substitution and elimination products, SN2 (Figure 5.2 – structure 3) and E2 products respectively (Figure 5.2 – structures 5&6). Since a decrease in temperature of the reaction medium may favour the substitution mechanism vs. elimination (Noller *et al.*, 1953), further experiments were performed in an ice bath (T=0-5°C overnight). The amount of E2 products was diminished by 50% in this case, leading to 75% formation of the product of interest after flash chromatography. The synthetic pathway described in Figure 5.2 has the advantage to give the Triskelion linker under its acetyl-protected form with more than 70% yield

over 2 steps (Figure 5.6 – Step 2), avoiding any intra- and inter-molecular disulfide linkage formation and allowing for long time storage stability (up to 8 months at -20°C, data not shown).

The last step of the synthesis proposed herein consists in the acetyl deprotection by methanolysis using sodium methoxide, namely the Zemplén transesterification, engaging slightly more than a stoichiometric amount of sodium methoxide per S-acetyl moiety (1.5 equivalent). Sodium methoxide was preferred to other bases like sodium hydroxide because it proceeds quickly without generating β -elimination and other racemization (Zervas *et al.*, 1963; Ren *et al.*, 2015). Complete acetyl deprotection was observed after 5-10 min (monitored by TLC and ^1H NMR analysis; Data not shown), maintaining the Triskelion linker in its acetyl-deprotected form with 95% yield (Figure 5.6 – Step 3). However, as reported by Wilson *et al.* (Wilson *et al.*, 2015), the yield of the reaction was limited by concomitant decomposition of the final product when longer reaction durations were performed (Stacked ^1H NMR spectra are available in Supp. Info.; Annexe C - Figure 7.11). Once deprotected, the Triskelion linker was ready to be directly engaged in the M-Unit aldehyde thioacetylation process, without further purification.

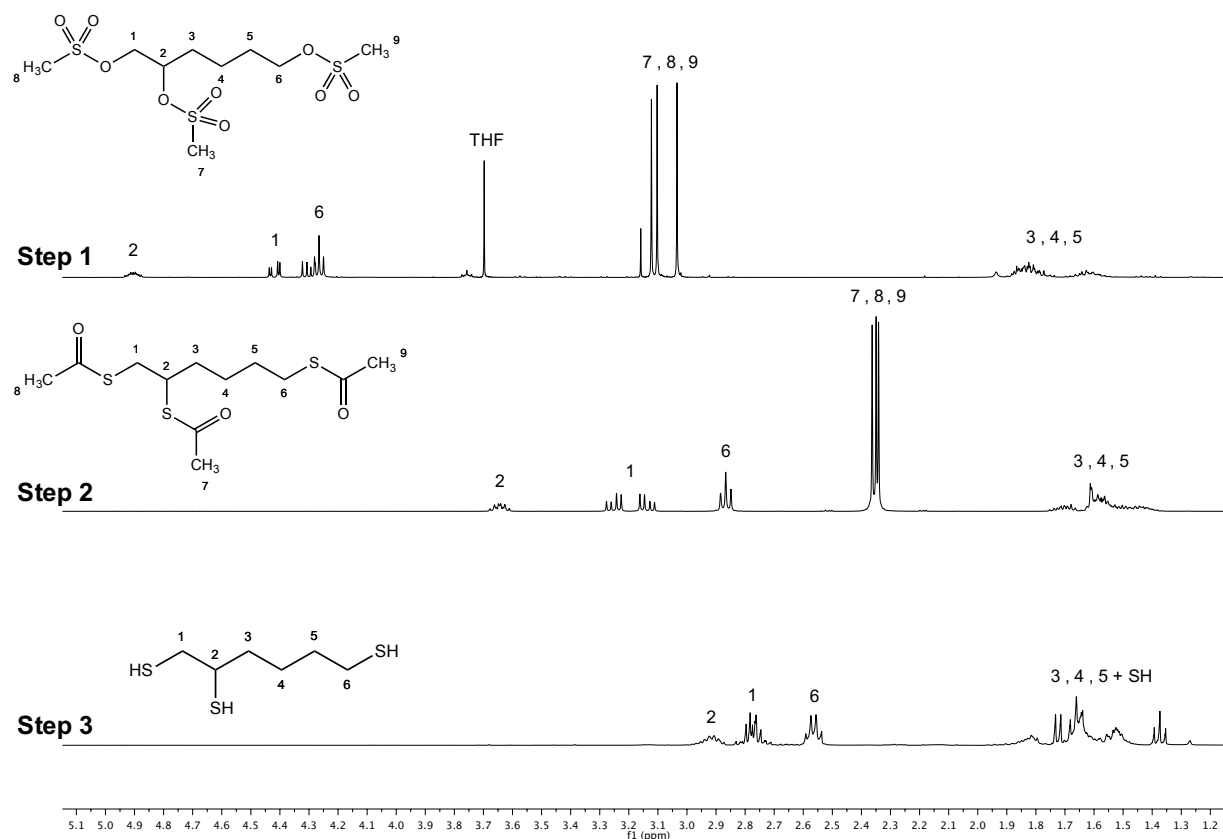


Figure 5.6 : Stacked ¹H NMR spectra (400 MHz, CDCl₃, ns = 32 scans, acquisition time = 2s, d1 = 2s) of the trivalent Triskelion linker 3-step synthesis. Step 1 (conversion of Tri-OH into Tri-OMs) was obtained with 93% yield, Step 2 (conversion of Tri-OMs into Tri-SAc) led to the desired tri-thioacetate with 75% yield and Step 3 (conversion of Tri-SAc into Tri-SH) gave the deprotected Triskelion linker with 95% yield. The products of the synthesis were also characterized by ¹³C NMR spectroscopy and Mass spectrometry (Supp. Info; Annexe C – Section 1).

5.4.2 The 2,5-anhydro-D-mannose aldehyde derivatization in MeOH with molecules bearing a thiol-hook leads to the intramolecular thioacetal as major product

In a preliminary study, Ethanedithiol (EDT) was engaged in the intramolecular thioacetylation process with the M-Unit aldehyde as described in the “Materials and methods” section above; except that a proportion of 30% isopropanol in 0.1M HCl was added to ensure complete solubilization of the species. The results of this semi-quantitative study indicated that the intramolecular thioacetal (5-membered ring thioacetal derivatized M-Units) is the only structure

detected, independently from the reaction duration and the post-reaction Method used (data not shown). The fact that no hemithioacetal intermediate was detected confirms that the *in situ* intramolecular thioacetylation process predominates when molecules bearing a thiol-hook are engaged with the M-Unit aldehyde.

The Triskelion linker was reacted with the 2,5-anhydro-D-mannose under the same conditions as for EDT, except that the co-solvent was changed to 30% THF or 90% MeOH in 0.1 M HCl. These co-solvents were selected to ensure complete solubility of the Triskelion, 2,5-anhydro-D-mannose and CS, thus allowing direct comparison of the reactions performed with the former and the latter. Since both the thiol-hook and the thiol-tail of the Triskelion linker may react with the M-Unit aldehyde, three different conjugates can form, as depicted in Figure 5.7: the intramolecular thioacetal A (through thiol-hook attack), the hemithioacetal B (after a first thiol-tail attack) and its stabilized linear thioacetal form C (through two successive thiol-tail attacks). LC-MS analyses were used to assess the influence of the reaction conditions (co-solvent and Method post-reaction) on the nature and the proportion of each possible final product.

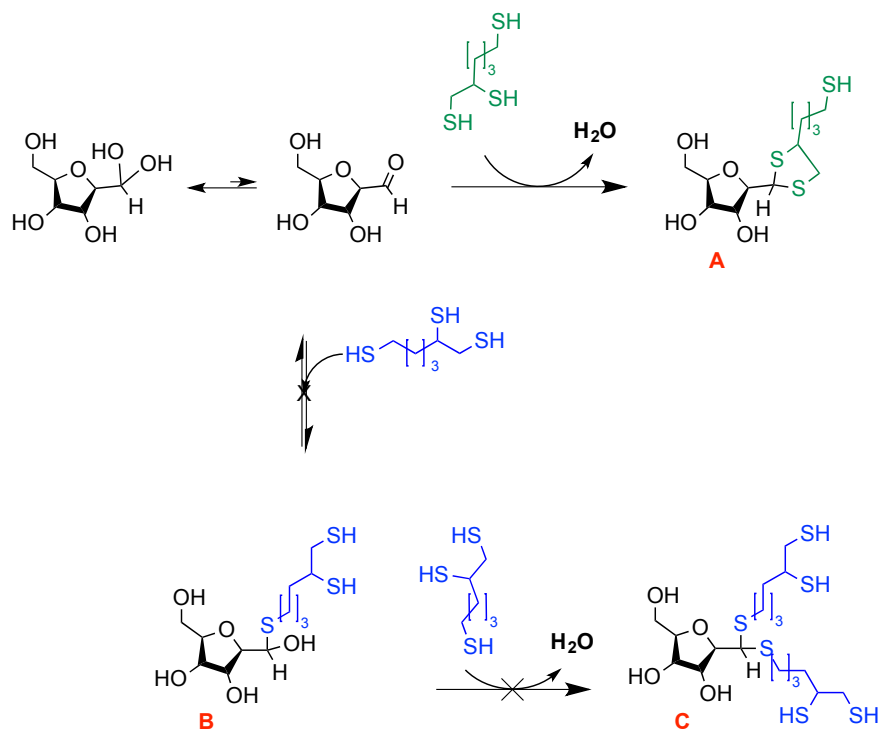


Figure 5.7 : Schematic representation of potential Triskelion-derivatized 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) products. Since the Triskelion linker carries three reactive thiol moieties able to engage

into the thioacetylation process (“thiol-hook” vs. “thiol-tail”), there are three potential observable structures: Structure A which corresponds to the expected intramolecular thioacetal obtained from thiol-hook reaction with the M-Unit aldehyde; Structure B represents the hemithioacetal intermediate that is formed upon reaction of the thiol-tail with the M-Unit aldehyde. This structure is unstable and it can be stabilized by a second Triskelion attack to form the structure C, the intermolecular thioacetal. All the potential disulfide related products such as A-ss-A, B and C with a disulfide closed hook were considered within the calculations without being represented in this figure. The LC-MS results indicate that the intramolecular thioacetal (structure A) corresponds to the major derivatization product observed by LC-MS when MeOH is used as co-solvent, whereas the intermolecular thioacetal (structure C) is favored when THF is used as co-solvent.

The results of the reactions performed between the Triskelion linker and 2,5-anhydro-D-mannose are reported in Table 5.1 and Figure 5.8. When MeOH was used as co-solvent, the results indicated that the Triskelion thiol-hook attack on the aldehyde of 2,5-anhydro-D-mannose lead predominantly to the formation of the intramolecular thioacetal (A). This finding is in agreement with what was observed with EDT, where results indicated that the stabilization of hemithioacetals occurred *in situ* through a 5-membered ring cyclization process. On the other hand, the use of THF as co-solvent appeared to favor the intermolecular thioacetal formation (C) at the expense of its intramolecular counterpart (A). This difference in reactivity could possibly be explained by the presence of peroxides that would have formed upon THF air oxidation (Burfield, 1982; Zhang, B. *et al.*, 2009). Indeed, THF peroxide traces may have deactivated the thiol-hook by oxidation while leaving the remaining thiol-tails free to react with the M-Unit aldehyde. In order to favor the intramolecular thioacetal formation (structure A), THF was not used as a co-solvent for the Triskelion linker conjugation to chitosans.

Table 5.1 : Sodium adducts of the 2,5-anhydro-D-mannose / Triskelion derivatization products observed in LC-MS.

Final products (see Figure 5.7)	Chemical formula	Expected m/z [M+Na] ⁺	Observed m/z [M+Na] ⁺
Intramolecular thioacetal (A)	C ₁₂ H ₂₂ O ₄ S ₃	349.0572	349.0562
	C ₂₄ H ₄₂ O ₈ S ₆	673.1096	673.1092
Hemithioacetal (B)	C ₁₂ H ₂₂ O ₅ S ₃	365.0522	365.0500

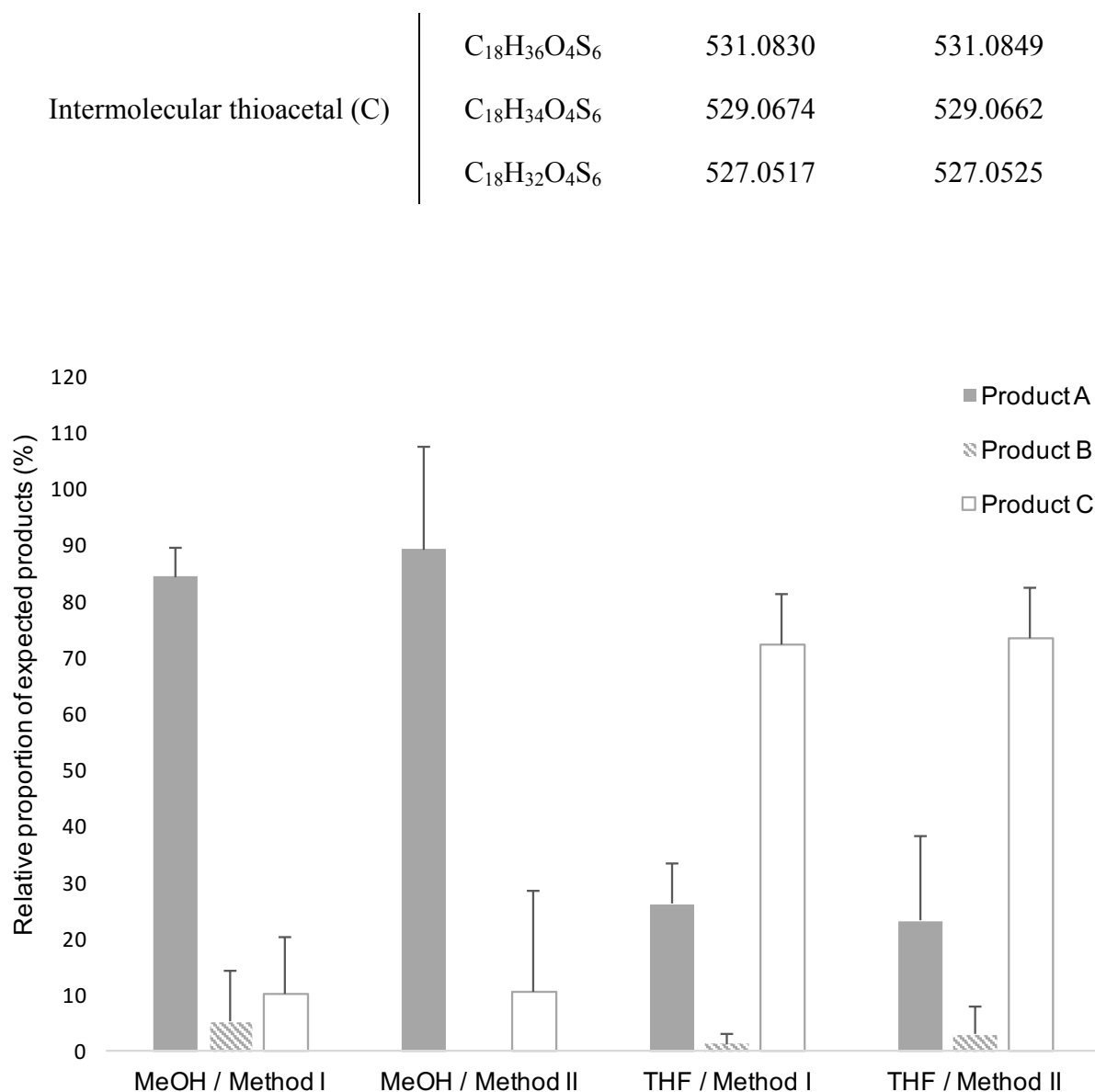


Figure 5.8 : Relative proportion of the M-Unit / Triskelion conjugation products observed by LC-MS (See Figure 5.7 and Table 5.1). Products A, B and C represent the intramolecular thioacetal, the hemithioacetal intermediate and the intermolecular or linear thioacetal, respectively. Each conjugation reaction (10-20 mM aldehyde, pH 1, T = 50°C, t = 72h, 30% THF or 90% MeOH) was performed in triplicates (N = 3) and the reaction media were treated as follows: Method I refers to a direct LC-MS analysis of the reaction medium whereas Method II stands for a concentration to dryness step prior to performing LC-MS. All the potential disulfide related products such as A-ss-A, B and C with a disulfide closed hook were considered within the calculations (Table 5.1). The results of this semi-quantitative study suggest that the intramolecular thioacetylation (A) is the favored mechanism of M-Unit / Triskelion conjugation when MeOH is used as co-solvent. On the other hand, the intermolecular thioacetal (C) is predominantly formed when THF is used as co-solvent, possibly because of some thiol-hook deactivation occurring due to the presence of peroxides within THF.

5.4.3 Efficiency of M-Unit CS HCl derivatization with molecules bearing a thiol-hook

5.4.3.1 CS end-groups were successfully activated with the Triskelion linker through an efficient intramolecular thioacetylation process

M-Unit CS 92-2 HCl salt were derivatized with molecules bearing a thiol-hook (EDT and Triskelion linker) and the purified conjugates were characterized by NMR spectroscopy, as described in Figure 5.3 – Part B. EDT experiments were performed in 30% iPrOH, whereas Triskelion conjugations were conducted in 90% MeOH. The functionalization degrees F of such derivatizations were calculated from the ^1H NMR spectrum of each purified conjugate using both Equation 1 and Equation 2. The results obtained with Equation 2 are shown in Figure 5.9.

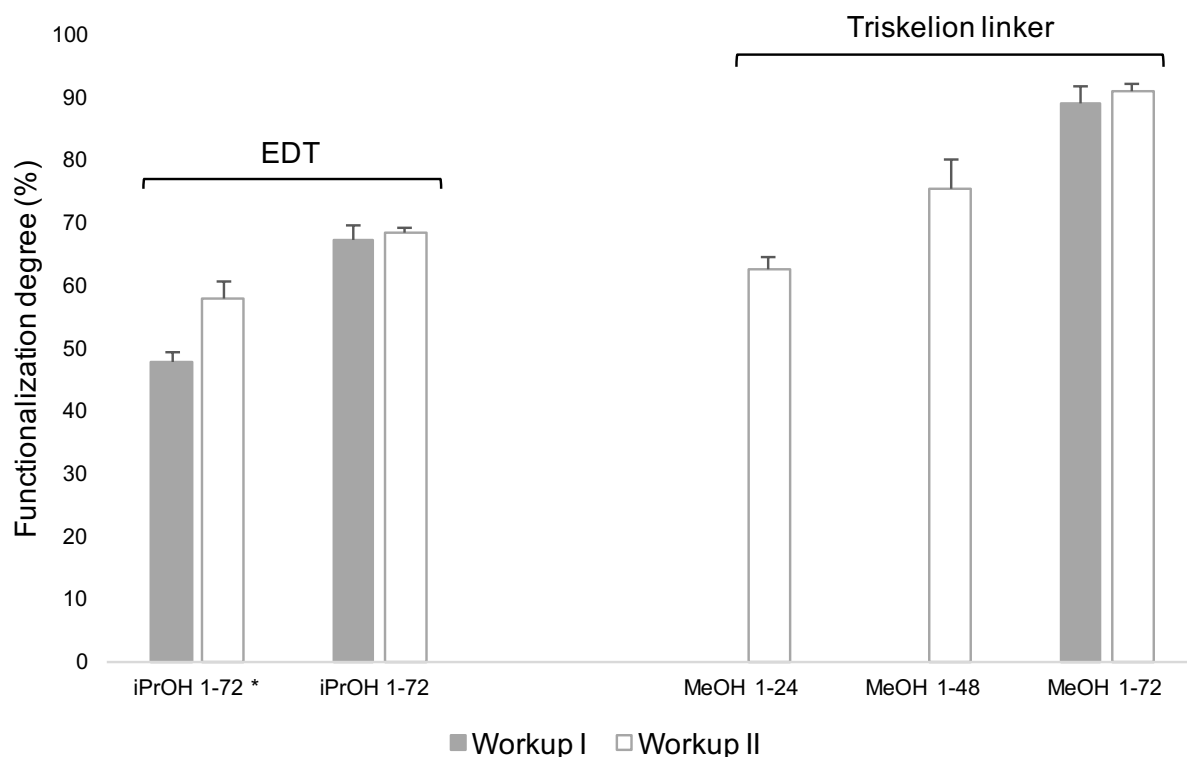


Figure 5.9 : Conjugation efficiency of the M-Unit CS HCl salt reacted with 20 equivalents of molecules bearing a thiol-hook (EDT and the Triskelion linker) per CS end-group for 24-72h at pH 1 and 50°C. 30% isopropanol (iPrOH) and 90% methanol (MeOH) were used as co-solvent for EDT and Triskelion linker solubilization, respectively. The nomenclature used in the graphical representation herein is: “Solvent pH-duration” (i.e., iPrOH 1-72 stands for 30% isopropanol at pH

1 for 72h). Reaction media were treated according to Workup I (alkali treatment + precipitation in THF) and Workup II (concentration to dryness + alkali treatment + precipitation in THF). Functionalization degrees (F) were calculated using Equation 2 (decrease in Gem-diol peak intensity) and confirmed with Equation 1 considering 1 molecule bearing a thiol-hook per purified CS adduct. Functionalization degrees calculated with Equation 1 are not shown here since they were with 2% of those obtained with Equation 2. (* corresponds to the results of the conjugations obtained with 5 equivalents of thiol-hook per M-Unit aldehyde instead of 20).

In a preliminary study, 5-20 equivalents of EDT were conjugated per M-Unit CS aldehyde in order to study the influence of increasing thiol-hook equivalents on the derivatization efficiency. As observed in our previous study (Pickenhahn *et al.*, 2015), a concentration step post-reaction enhances the intermolecular thioacetylation process when a small amount of thiol-bearing molecules are engaged by favoring both the formation of the hemithioacetal intermediate and the second thiol molecule attack to form the final stable thioacetal. As shown in Figure 5.9, the *in situ* intramolecular thioacetal formation efficiency when 5 equivalents of EDT per CS end-group were used (iPrOH 1-72* Workup I) was enhanced with a concentration step post-reaction (iPrOH 1-72* Workup II), therefore leading to better conversion degrees (from 48 ± 1 to $58 \pm 3\%$). On the other hand, when 20 equivalents of EDT were added, such concentration step post-reaction did not affect the conjugation efficiency since similar functionalization degrees were calculated independently from the Workup implemented (68 ± 2 and $69 \pm 1\%$ for iPrOH 1-72 Workups I and II, respectively).

Similar experiments as presented above with EDT were performed with 20 equivalents of Triskelion linker, except that 90% MeOH was used as co-solvent. After 72h reaction (Figure 5.9; MeOH 1-72), the drying step post-reaction does not have any significant impact on the conjugation efficiency since comparable functionalization degrees were obtained regardless the Workup performed ($89 \pm 3\%$ and $91 \pm 1\%$ (Figure 5.10) using Workup I and II, respectively). As observed in our previous study (Pickenhahn *et al.*, 2015), our results reveal that a significant *in situ* thioacetal formation can be achieved when a large excess of thiol-bearing molecules is used.

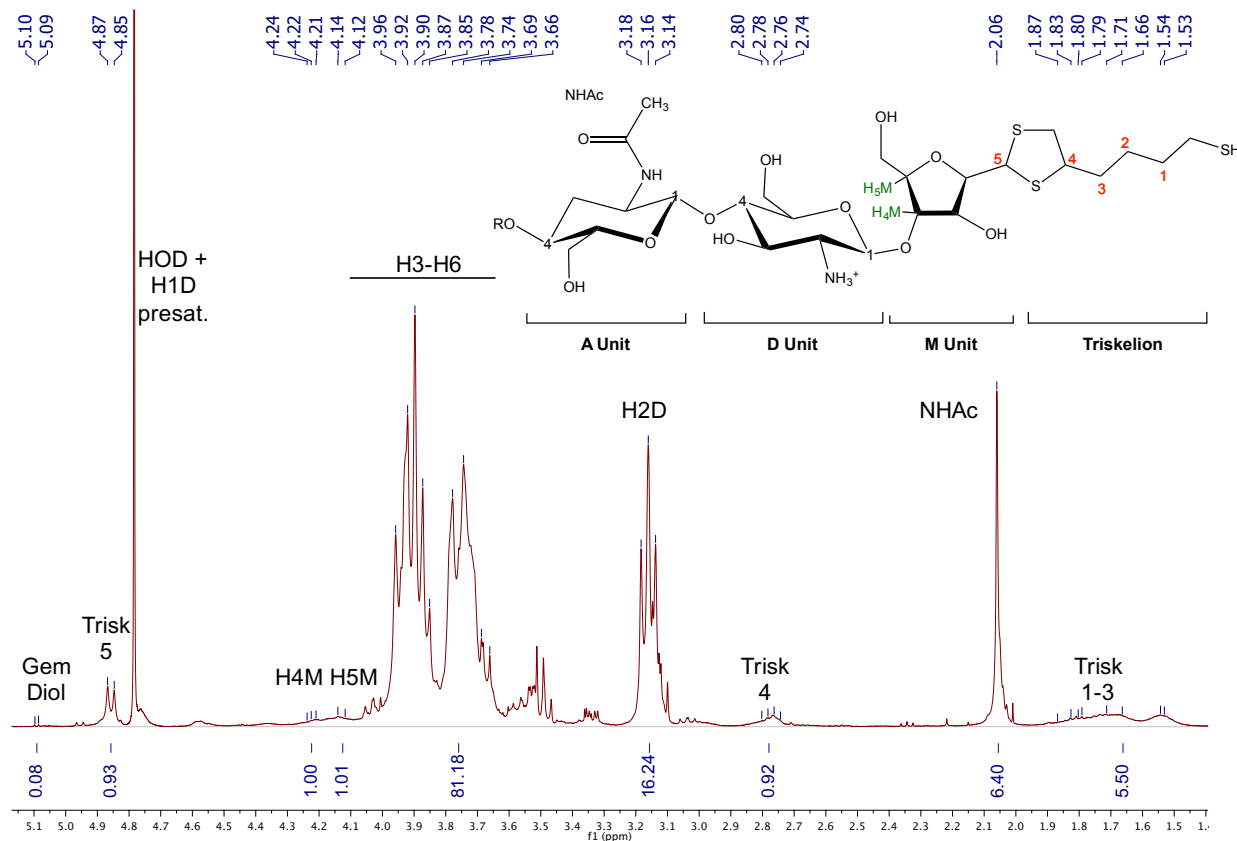


Figure 5.10 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, ns=64 scans, acquisition time=2s, d1=10s. The sample herein corresponds to the CS-b-Triskelion conjugate obtained after 72h reaction in 90% MeOH (MeOH 1-72) and processed as per Workup II. Functionalization degrees F of 91% and 92% were obtained using Equations 1 and 2, respectively.

A time-point experiment was also performed in order to determine if the reaction duration may be lowered to 48h and then to 24h while giving such high functionalization degrees by concentrating the reaction media (Workup II). Both Equations 1 and 2 indicate $63 \pm 2\%$ efficiency after 24h, whereas $78 \pm 1\%$ of CS end-group aldehydes were converted after 48h reaction (Figure 5.9; MeOH 1-24 & MeOH 1-48).

These results indicate that the equilibrium between the M-Unit aldehyde and the hemithioacetal formed upon thiol-hook molecule addition (Figure 5.11) can be displaced towards the latter by increasing both the equivalents of thiol-bearing molecules and the reaction duration.

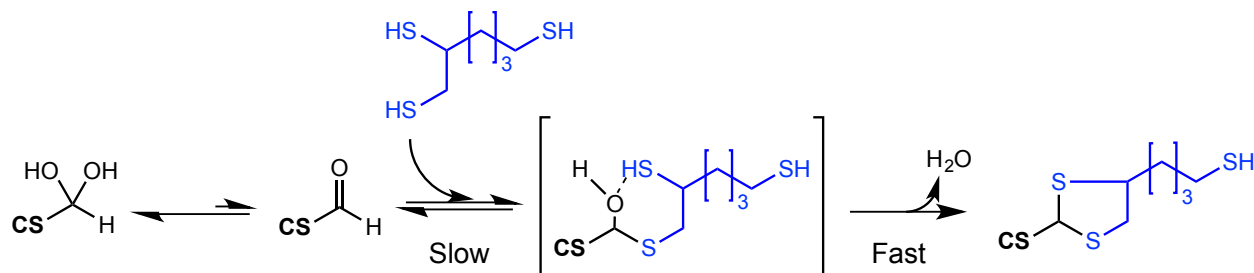


Figure 5.11 : Proposed mechanism of the Triskelion linker conjugation to M-Unit CS under acidic aqueous conditions. Although the rate limiting step of this conjugation process is the transformation of the gem-diol into its corresponding active aldehyde, the latter is engaged in an equilibrium with the hemithioacetal intermediate (in brackets) upon thiol-hook addition (Triskelion linker shown herein). As suggested by LCMS studies, the hemithioacetal intermediate is readily transformed into its stable thioacetal counterpart with the release of a water molecule. The equilibrium between the M-Unit aldehyde and the hemithioacetal can be displaced towards the latter by increasing both the amount of thiol-hook engaged in the reaction and the reaction duration.

The effectiveness of such transformation was assessed by DOSY NMR experiments (e.g., Figure 5.12), which provided evidence that the trivalent linker was covalently attached to the CS chain. Indeed, both the Triskelion linker and CS chains had the same translational diffusion coefficient in D_2O at $25^\circ C$, despite of their significant molecular weight difference ($182.03 \text{ g.mol}^{-1}$ vs. 3200 g.mol^{-1} , for the trivalent linker and CS chain, respectively).

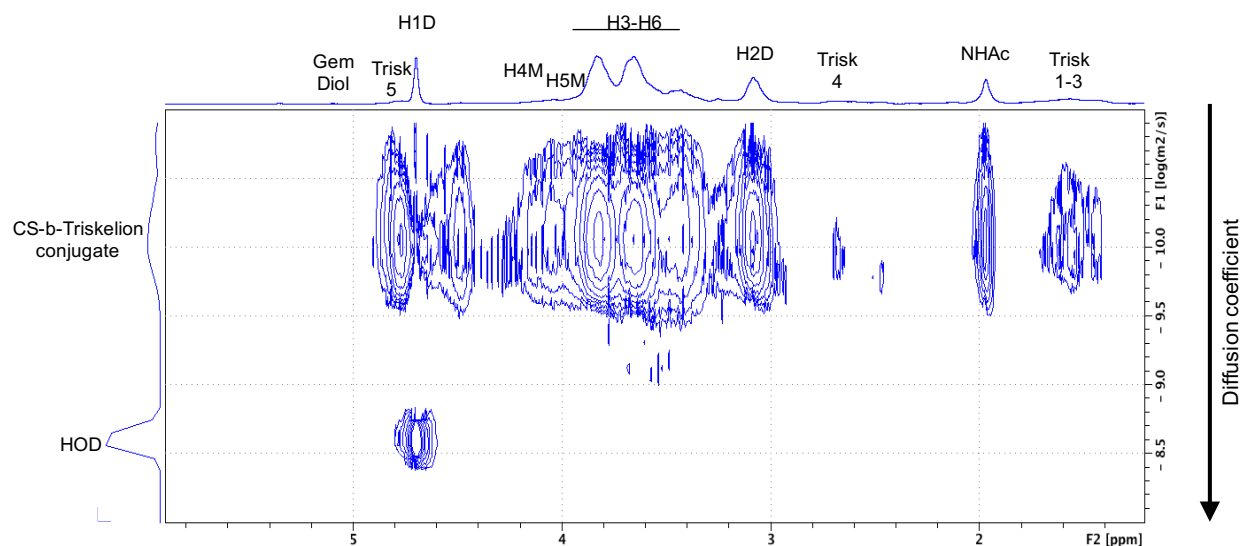


Figure 5.12 : DOSY spectrum of the CS-b-Triskelion conjugate (MeOH 1-72, Workup II). 16 gradients between 2.5 and $50.0 \text{ gauss.cm}^{-1}$ with a gradient pulse (δ) of 3 ms , a diffusion time (Δ)

of 150 ms. Both CS and Triskelion have the same translational diffusion coefficient at 25°C in D₂O, indicating that they are joined together by a covalent bond.

5.4.3.2 LC-MS and NMR reveal the regioselectivity of the CS-end-group aldehyde intramolecular thioacetylation process

The regioselectivity and the stoichiometry of this transformation has been already assessed by LC-MS, where one molecule bearing a thiol-hook was covalently conjugated per 2,5-anhydro-D-mannose aldehyde via a 5-membered ring formation. Both the regioselectivity and the stoichiometry of the CS end-group aldehyde derivatization with thiol-hook molecules were also confirmed by calculating and comparing the functionalization degrees of these transformations with Equation 1 (based on thiol-hook representative peaks integration values and where 1 thiol-hook per CS end-group was considered) and Equation 2 (based on the concomitant diminution of the *Gem*-diol peak intensity and which is independent from the number of conjugated molecules bearing a thiol-hook). Thus for each conjugation reported in Figure 5.9, similar functionalization degrees ($F \pm 2\%$) were calculated using both Equations (Data not shown), suggesting that 1) the thioacetylation occurred on the CS extremity, namely the M-Unit aldehyde, and 2) that the intramolecular thioacetylation process dominates with respect to the intermolecular process.

5.4.4 The terminally activated CS efficiently and selectively react with thiol reactive surface

Reduced CS-b-Triskelion mixture (MeOH 1-48 processed with Workup II, $F = 70\%$) was incubated with thiol-activated magnetic beads for 24h under inert atmosphere at room temperature. The agarose-coated PureCube thiol-activated magnetic beads carrying ethylenediamine spacers were chosen to minimize non-specific binding with CS. Undesirable reactions were also minimized by solubilizing CS mixtures in acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl as conjugation buffer, ensuring CS amines complete protonation while screening electrostatic repulsions between CS chains that could potentially reduce grafting efficiency as the process evolves.

A 2-fold excess of activated CS ($n_{SH} = 3 \mu\text{mol}$ vs. $1.5 \mu\text{mol}$ pyridyl disulfide moieties) was reacted with the beads to ensure maximum coating efficiency onto bead surface. Both the bead functional group density and the reaction efficiency were determined by absorbance measurements of the

pyridinethione released group ($\lambda = 343\text{nm}$, $\epsilon = 7175 \text{ L.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ in 50 mM acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl; Data not shown).

After unreacted CS removal, CS-b-Triskelion was released by tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) reduction, giving the desired CS-b-Triskelion conjugate with 51% yield. Considering the functionalization degree of the initial mixture ($F = 70\%$) engaged in this coating process, the maximum amount of CS-b-Triskelion expected to be selectively conjugated to the beads would be 3.5 mg (2:1 CS-b-Triskelion / pyridyl disulfide functional group stoichiometry) and $m=1.8$ mg CS-b-Triskelion was recovered. TCEP was preferred to other reductants (such as dithiothreitol or β -mercaptoethanol) because of its effectiveness in acidic conditions (Getz *et al.*, 1999). Nonetheless, since TCEP bears 3 carboxylic acid moieties that have low pKa as 4.3, 3.6 and 2.9 (Krężel *et al.*, 2003), electrostatic interactions with CS amines were avoided by rinsing the conjugates with 0.1 M HCl solution in order to neutralize the carboxyl moieties.

To assess the selectivity of the reaction, the conjugation process described above was also performed with non-modified CS. After 24h incubation with freshly-activated beads, CS quantification by the Orange II assay revealed that more than 95% of the non-modified polymer remained within the supernatant, whereas less than 5% of CS was recovered after the entire process (Data not shown). Given the precision of the assay, these results indicate that non-modified CS did not adsorb to or react with the surface during the process and that only thiol-activated CS bind to the bead surface through disulfide linkage.

The selectivity of the reaction was further assessed by recovering and analyzing the conjugated CS from the beads using TCEP, after careful removal of any non-reacted CS from the conjugation mixture (removal of supernatant). In order to be able to confirm the selectivity of the conjugation reaction, a CS with $F=70\%$ was specifically chosen for this experiment. Indeed, if only CS-b-Triskelion adducts reacted with the beads, the functionalization degree of the recovered CS population should be higher than that of starting material, given that unreacted/non-modified CS were discarded within the supernatant. ^1H NMR spectra were used to calculate the functionalization degree of the CS mixture engaged in the process (Figure 5.13 – A) and that of the recovered CS (Figure 5.13 – B). For comparison purpose, both spectra were normalized based on the CS acetyl peaks (NHAc; $\delta = 2.06$ ppm) since the latter remains unchanged upon this treatment. Both Equations 1&2 indicated 70% functionalization in starting CS vs. 95% in recovered CS, indicating

that only activated CS reacted with the surface functional groups, demonstrating the selectivity of the reaction. This result also indicated that such chemistry could be used in HPLC columns to obtain highly purified activated Triskelion CS.

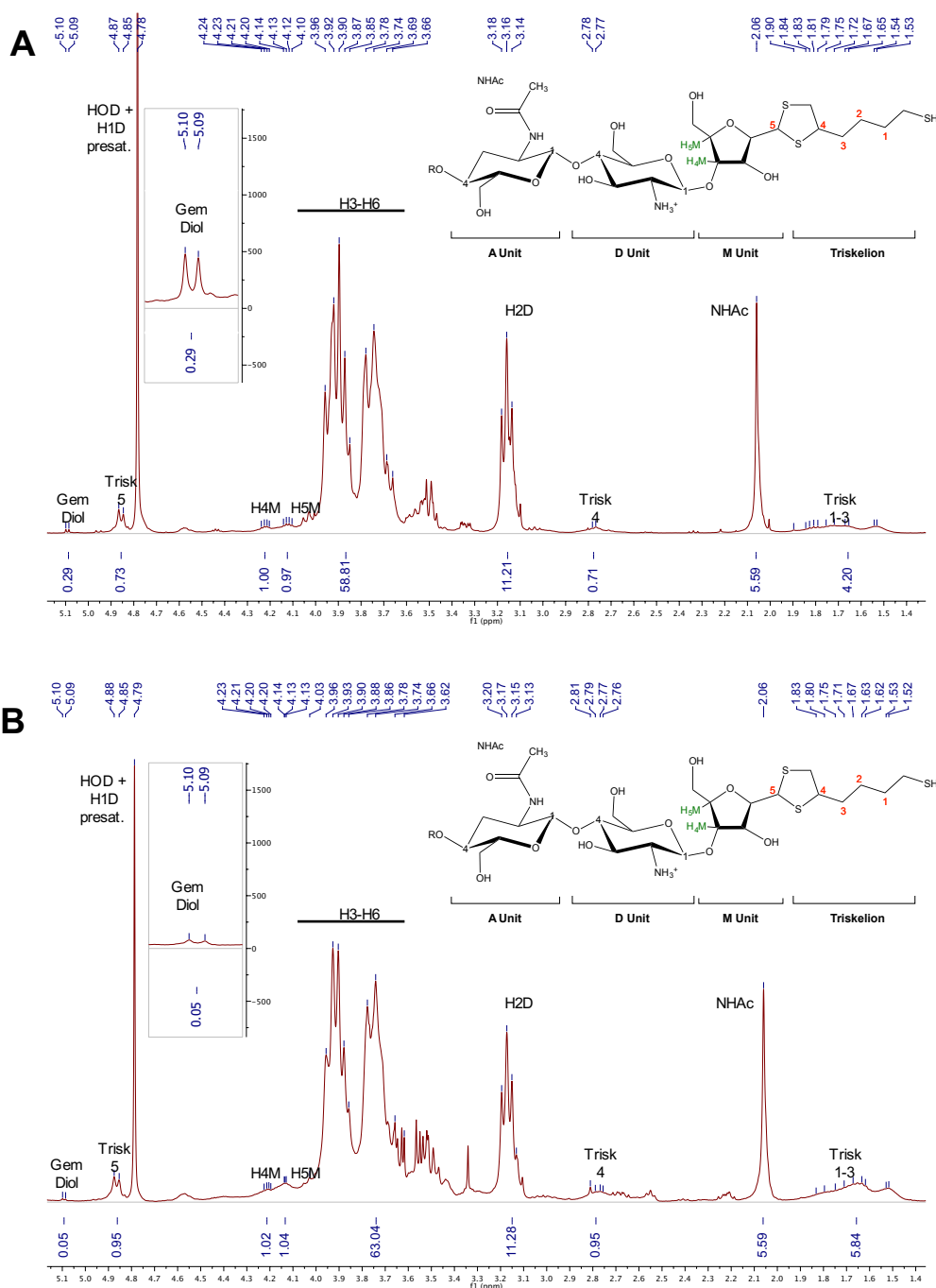


Figure 5.13 : ^1H NMR spectra (400 MHz, D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, $n_s=256$ scans, acquisition time=2s, $d_1=10\text{s}$) representing A) the initial CS + CS-b-Triskelion mixture that was engaged with the thiol-activated magnetic beads and B) the released CS-b-Triskelion post treatment. Both spectra were

normalized using the unmodified CS acetyl peak ($\delta = 2.06$ ppm, 5.59 H) for comparison purpose. Both equations 1&2 were used to calculate functionalization degree of CS mixture and released CS calculations, giving 70% (± 2) and 95% (± 2), respectively. This result indicates that only CS-b-Triskelion adducts bind to the thiol-activated beads through disulfide linkage displacement.

5.5 Conclusions

This study was dedicated to the development of a novel and improved thioacetylation process to terminally activate chitosan. This process relies on the use of a specifically designed and synthesized trivalent linker (the Triskelion) that bears a thiol-hook and a thiol-tail, allowing for chitosan terminal activation through an efficient intramolecular conjugation mechanism and subsequent functionalization with any thiol-reactive structure, respectively. A combination of mass spectrometry and NMR spectroscopy was used to assess the efficiency and confirm the regioselectivity of the reaction. The function of such terminally activated chitosan was validated in a direct application where CS-b-Triskelion conjugates were used to modify the surface of magnetic beads through labile disulfide linkages formation. Compared to our previously proposed thioacetylation process, where two successive thiol attacks on the CS end-group aldehyde are necessary to stabilize the hemithioacetal intermediates into their final thioacetal structures (Pickenhahn *et al.*, 2015), this novel approach allows for a more efficient one-step CS end-group activation by thioacetylation. Importantly, the use of the Triskelion linker directly overcomes the two main shortcomings of our previously proposed approach, namely, the potential limited efficiency due to steric hindrance of large thiol-bearing substituents and the incompatibility of the process with acid-labile moieties to be conjugated.

Ongoing studies are focused on the purification of CS-b-Triskelion conjugates by chromatography, using pyridyl disulfide activated resin; and on the development of novel conjugation strategies producing Michael type addition and disulfide linked adducts.

The herein described CS-b-Triskelion synthesis offers new perspectives for CS biomedical applications such as CS-block modifications and brush-like surface coatings through labile/non-labile linkages.

5.6 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and ANRis Pharmaceuticals. The authors would like to acknowledge Alexandra Furtos (Mass Spectrometry, Université de Montréal), Cédric Malveau and Sylvie Bilodeau (NMR spectroscopy, Université de Montréal) for their help in characterization.

CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif principal de ce projet de Doctorat fut la synthèse d'un copolymère en blocs à base de chitosane (CS) et de poly(éthylène glycol) (PEG), noté CS-b-PEG, en tant que vecteur d'acides nucléiques (NA).

6.1 Omniprésence du *gem*-diol en extrémité du CS

La première étape à franchir pour accomplir la synthèse du copolymère CS-b-PEG fut d'identifier le point d'attache du PEG en extrémité du CS. La littérature suggère deux positions possibles, à savoir: (1) l'apparition d'un groupement aldéhyde lors de l'ouverture du dernier monomère de la chaîne de CS; (2) la production d'une unité 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit), portant également une fonction aldéhyde, lors de la dépolymérisation du CS à l'acide nitreux (HONO). Bien qu'il ait été démontré dans les deux approches proposées que l'aldéhyde peut être présent sous sa forme hydratée et non-réactive, notre choix s'est porté sur la deuxième solution, plus accessible d'un point de vue synthétique.

Néanmoins, il a été rapporté que la M-Unit issue de la dépolymérisation du CS au HONO est instable après sa réhydratation en conditions aqueuses à faible pH. En effet, la neutralisation des amines du CS après dépolymérisation induirait leur réaction sur l'aldéhyde terminal de la M-Unit en formant des imines ou bases de Schiff; réaction favorisée par lyophilisation. Lors de la réhydratation du CS en condition acide, la M-Unit est alors clivée du CS et se trouve transformée en hydroxyméthylfurfural (HMF) par réarrangement intramoléculaire (Tømmeraas, K *et al.*, 2001). L'attaque nucléophile des amines sur l'aldéhyde terminal de la M-Unit étant en cause dans ce phénomène, les amines latérales du CS ont été protonnées par dialyse à pH acide et donc rendues non-réactives avant lyophilisation, permettant ainsi de garder l'intégrité du 2,5-anhydro-D-mannose en extrémité du CS.

La caractérisation physico-chimique de cet aldéhyde a permis de mettre en avant que sa forme hydratée, dite *gem*-diol, est omniprésente en solution aqueuse; ce phénomène étant lié principalement à sa stabilisation par liaisons hydrogènes. Ainsi l'équilibre existant entre le *gem*-diol (non-réactif) et l'aldéhyde (réactif) correspondra à l'étape limitante de toute transformation en bout de chaîne du CS.

6.2 La thioacétylation de l'aldéhyde de la M-Unit nécessite deux attaques de thiols successives

Le CS disposant de nombreuses unités réactives au sein de ses monomères (amines et hydroxyles), notre choix s'est porté sur la chimie des thiols car ces derniers sont considérés comme extrêmement réactifs envers les carbonyles. La réactivité des thiols sur les carbonyles en solution aqueuse fut étudiée par Jencks *et al.* à la fin des années 1960 (Lienhard & Jencks, 1966; Barnett & Jencks, 1967; Sander & Jencks, 1968). Ils démontrèrent que cette réaction est possible dans l'eau à condition de procéder à pH très acide. Ils étudièrent également la sensibilité de l'équilibre entre l'aldéhyde et l'hémithioacétal formé lors de l'addition de thiol sur le carbonyle, face aux variations de pH. Par contre, aucune mention de stabilisation de cet hémithioacétal en thioacétal en solution aqueuse n'a été mentionnée jusque-là.

Le mécanisme de thioacétylation de l'aldéhyde terminal du CS porté par la M-Unit, représenté Figure 6.1, a été étudié de manière semi-quantitative par chromatographie liquide – spectrométrie de masse (LC-MS), en engageant des thiols avec le 2,5-anhydro-D-mannose. Cette étude a révélé que deux attaques régiosélectives successives de thiol sur l'aldéhyde terminal du CS ainsi que la libération d'une molécule d'eau sont nécessaires à la stabilisation de l'intermédiaire hémithioacétal en thioacétal. Il a également été démontré que cette stabilisation peut être favorisée par une étape de concentration par lyophilisation lorsque peu d'équivalents de thiols sont engagés dans cette réaction. L'efficacité d'une telle transformation fut déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN), en analysant les produits issus de la réaction entre des thiols et du CS portant la M-Unit, atteignant entre 55 et 70% de conversion selon le type de thiol engagé.

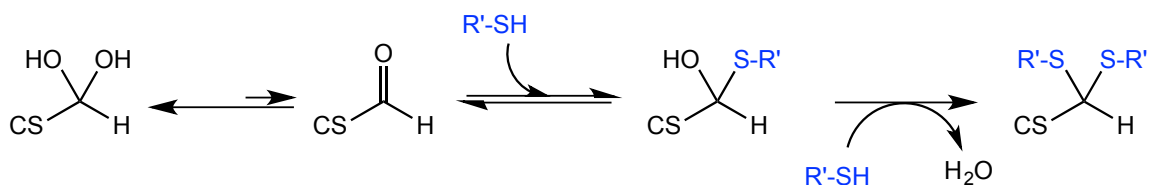


Figure 6.1 : Représentation schématique de l'addition de thiol sur l'aldéhyde terminal du CS porté par la M-Unit en conditions aqueuses. Ainsi, en dépit du fait que l'aldéhyde soit principalement présent sous sa forme hydratée et non-réactive, l'équilibre de formation de l'intermédiaire hémithioacétal peut être déplacé par stabilisation de ce dernier lors d'une seconde attaque de thiol, formant le thioacétal correspondant.

Ce nouveau procédé de thioacétylation de l'extrémité du CS présente certains avantages par rapport à la chimie click-oxime, chimie de conjugaison alternative développée lors d'études de dérivatisation de l'aldéhyde terminal du CS (Benediktsdottir *et al.*, 2012; McManus, 2012; Novoa-Carballal & Muller, 2012), à savoir : (1) Cette chimie peut être utilisée sans interférer avec les amines du CS qui sont complètement protonnées et donc non-réactives ; (2) Cette chimie est efficace en conditions aqueuses et aucun ajout de co-solvant n'est nécessaire ; (3) Aucun traitement chimique additionnel (ex : réduction par hydrures) n'est indispensable à la stabilisation du conjugué final.

6.3 La synthèse du copolymère en blocs CS-b-PEG₂ a permis la formation de BICs

En tant qu'application directe de cette nouvelle chimie de conjugaison, le copolymère en bloc CS-b-PEG₂ a été synthétisé avec succès par thioacétylation, en engageant du PEG-thiol (PEG-SH, Mn = 2 kDa) avec du CS portant la M-Unit (Mn = 10 kDa), tel que proposé dans la Figure 6.2 – Partie A. Ce copolymère en bloc a alors été utilisé pour préparer des polyplexes avec de l'ADN plasmidique. Le fait que ces nanoparticules présentent une morphologie uniformément sphérique comparé aux morphologies variées des polyplexes natifs (mélange de sphères, toroïdes et bâtonnets) produits à partir de CS non-modifié, suggère la formation de BICs (Figure 6.2 – Partie B).

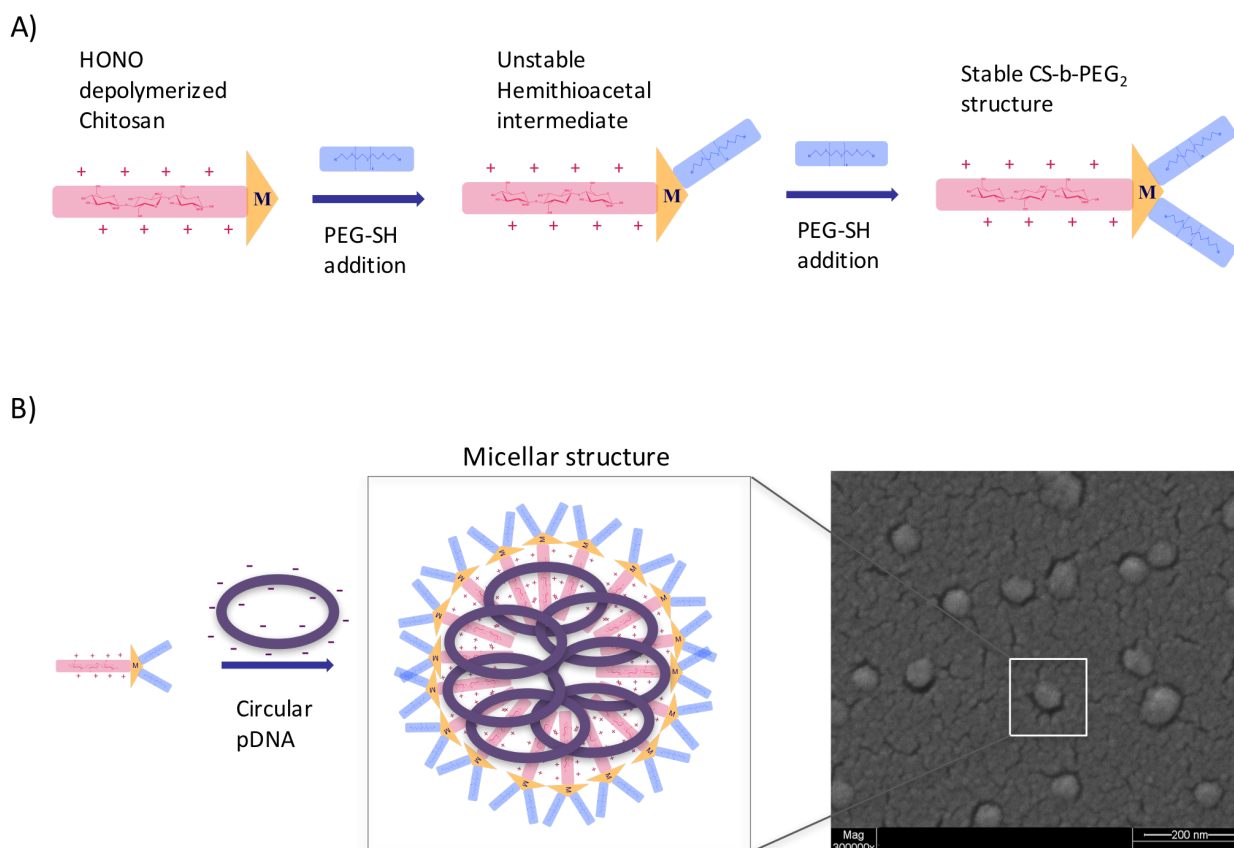


Figure 6.2 : Résumé graphique du premier article dédié à ce projet de Doctorat (Pickenhahn *et al.*, 2015). A) Représentation schématique de la PEGylation en bout de chaîne du CS par thioacétylation: Bien que l'aldéhyde porté par la M-Unit soit majoritairement présent sous sa forme hydratée et non-réactive, une première attaque de PEG-thiol (PEG-SH) sur l'aldéhyde de la M-Unit forme un intermédiaire hémithioacétal instable. Une seconde attaque de PEG-thiol est alors

nécessaire afin de stabiliser cette structure, formant le bloc-copolymère CS-b-PEG₂ correspondant par thioacétylation. B) Formation de BICs : Les copolymères CS-b-PEG₂ ont ensuite été engagés avec de l'ADN plasmidique pour former des structures polyélectrolytes ayant un caractère micellaire, les BICs.

Le copolymère CS-b-PEG₂ a été synthétisé avec 50% de degré de fonctionnalisation (F), ce qui signifie qu'un mélange [1 :1] de CS non-modifié et de CS-b-PEG₂ a été utilisé pour la formation de polyplexes avec l'ADN plasmidique. Bien que la formation de BICs ait été confirmée par microscopie électronique, il aurait été préférable de purifier le copolymère avant de l'engager dans les essais de formation de nanoparticules, notre but étant d'uniformiser les structures.

Malheureusement toutes les tentatives d'isolation du copolymère ont échoué. Dans un premier temps, le CS perdant sa solubilité à pH basique, des essais de précipitation différentielle du CS par rapport au CS-b-PEG₂ (plus hydrophile grâce à ses 2 composantes de PEG) ont été effectués en augmentant progressivement le pH du milieu. Cette méthode n'a pas permis d'isoler le copolymère de façon significative, certainement à cause de la haute polydispersité du CS. Ainsi la PEGylation de CS très monodisperse aurait pu être envisagée afin d'obtenir des copolymères avec une grande pureté. Idéalement, la purification du CS-b-PEG₂, ainsi que la réduction de la polydispersité des chaînes de CS avant le processus de thioacétylation, pourraient s'effectuer par GPC préparative. Par contre, cette technique aurait demandé beaucoup de développement avec nos appareils et ne disposant pas des colonnes de purification adéquates, une méthode alternative dite par ultrafiltration a été mise œuvre. Le principe de séparation de cette méthode est fondé sur la taille relative du copolymère (14 kDa) par rapport à celle du CS non-modifié (10 kDa) et des filtres permettant de conserver le copolymère tout en se débarrassant du CS libre ont été utilisés. La faible efficacité de ce processus ainsi que des pertes de matériel dépassant les 50%, nous ont contraint à faire un pas en arrière et à repenser le procédé de conjugaison par thioacétylation.

6.4 Activation de l'extrémité terminale du CS

L'efficacité relative de la PEGylation de l'extrémité terminale du CS par thioacétylation évoquée précédemment ($F = 50\%$) fut attribuée d'une part à l'omniprésence de la forme hydratée de l'aldéhyde de la M-Unit (première étape limitante) ; et d'autre part au fait que la seconde attaque nucléophile nécessaire à la stabilisation de l'intermédiaire hémithioacétal soit limitée par l'encombrement stérique occasionné par la présence de la première chaîne de PEG (seconde étape limitante). Souhaitant fournir des structures uniformes et bien définies pour nos applications et étant donné la complexité de la purification des copolymères issus de cette transformation, une nouvelle approche a été proposée : l'activation du bout de chaîne du CS par un linker trivalent, le Triskelion.

Avec son crochet-thiol, le Triskelion a été conçu pour augmenter l'efficacité de la réaction de thioacétylation sur l'aldéhyde terminal du CS au travers d'un mécanisme intramoléculaire, tel que démontré par LC-MS et RMN. En effet des degrés de conversion de l'aldéhyde terminal du CS avoisinant les 90% ont été constatés en engageant le crochet-thiol du Triskelion. Ainsi, comparé à l'approche initiale dans laquelle deux attaques de thiols successives sont indispensables à la stabilisation de la structure finale, cette nouvelle approche permet une activation efficace de l'extrémité du CS par thioacétylation en une seule étape (Figure 6.3).

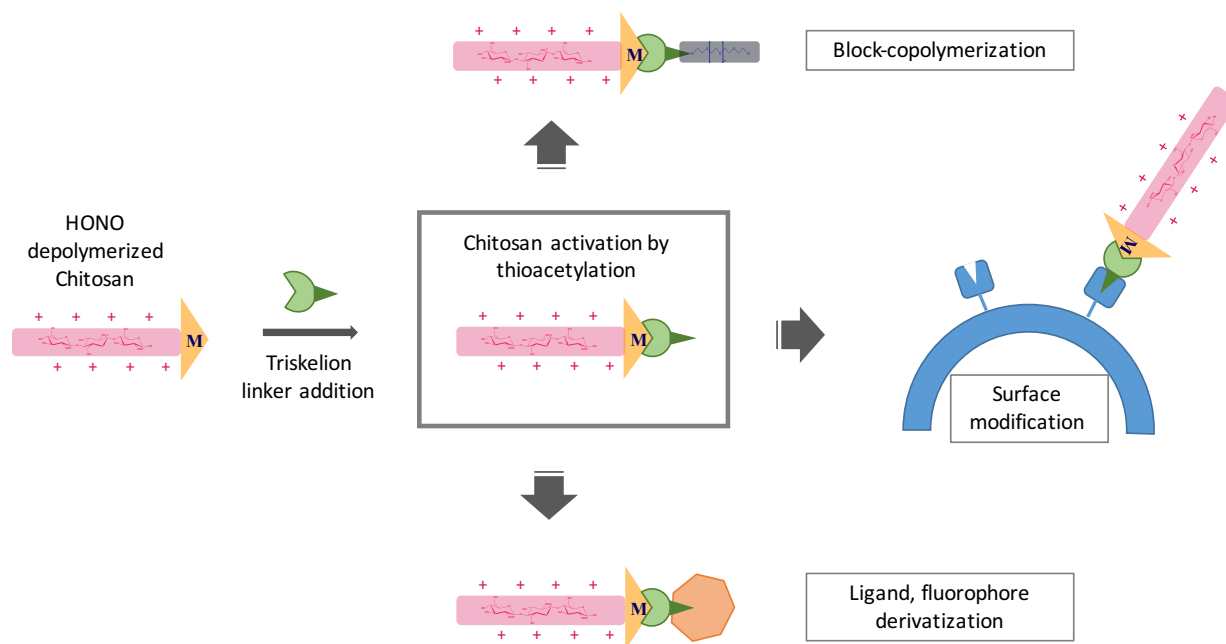


Figure 6.3 : Représentation schématique de l'activation de l'extrémité du CS par thioacétylation régiosélective. Dans une première étape, l'aldéhyde terminal porté par la M-Unit a été engagé avec un linker trivalent, le Triskelion, *via* un mécanisme de thioacétylation intramoléculaire. Les conjugués obtenus pourront alors être utilisés pour attacher l'extrémité du CS sur des surfaces, des polymères et des ligands portant des fonctions réactives aux thiols et ce en utilisant des chimies moins agressives.

Avec son autre extrémité portant la fonction thiol restante, le Triskelion a également été conçu pour réagir sélectivement avec des espèces chimiques réactives aux thiols, *via* déplacement de ponts disulfures ou addition de Michael (Figure 6.3). En effet, la réactivité de la fonction thiol portée en extrémité des conjugués CS-b-Triskelion a été démontrée à l'aide de leur conjugaison sélective par ponts disulfures sur des billes magnétiques portant des fonctions dithiopyridines. Bien que les conjugués CS-b-Triskelion ont été produits avec grande efficacité ($F \geq 85\%$), ces derniers pourront être purifiés davantage par chromatographie covalente *via* la formation de liaisons labiles avec une phase stationnaire activée avec des groupements dithiopyridines.

La conjugaison du Triskelion sur l'aldéhyde de la M-Unit se faisant à pH très acide, toute introduction de molécules sensibles (ligands, fluorophores, etc.) était jusque-là proscrite avec le premier procédé de thioacétylation. Cette nouvelle technique offre ainsi l'avantage de pouvoir procéder à la modification de l'extrémité du CS de manière à la fois chimio- et régiosélective dans des conditions plus douces.

Bien que majoritairement présent sous sa forme inactive, la transformation de l'aldéhyde du CS (électrophile) en thiol (nucléophile), *via* la conjugaison du Triskelion, peut être considérée comme une inversion de polarité qui a pour conséquence l'activation de l'extrémité terminale du CS. Il sera alors possible de synthétiser des conjugués de CS-b-Triskelion de tailles variées, de les purifier, de les conserver et de les engager ultérieurement pour l'application choisie au travers de chimies moins agressives.

CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans le domaine des applications biomédicales, et plus précisément au niveau de la vectorisation d'acides nucléiques (NA), le chitosane (CS) est le polymère cationique le plus utilisé de par son extrême biocompatibilité et sa très faible toxicité. Son vaste champ d'action s'explique par le fait que ses paramètres physico-chimiques intrinsèques, que sont son poids moléculaire (M_n et M_w) et son degré de désacétylation (DDA), peuvent être aisément modulés afin de satisfaire une application donnée. De nombreuses modifications extrinsèques ont été également apportées au CS, telles que l'adjonction de poly(éthylène glycol) (PEG), principalement au niveau des amines et des hydroxyles de sa chaîne latérale. Bien que pléthore de chimies soient disponibles dans la littérature afin de synthétiser de tels conjugués, ces derniers présentent toutefois certaines limitations quant à leur utilisation pour la vectorisation d'acides nucléiques (AN). En effet, la capacité du CS à former des interactions électrostatiques avec l'AN pourrait être altérée de par l'occupation de ses amines et de par l'encombrement stérique lié à l'adjonction de macromolécules en position latérale. Le CS disposant de nombreux hydroxyles et amines en tant que points d'attache, un autre inconvénient serait le manque d'uniformité des structures obtenues.

Afin de modifier le CS par PEGylation en passant outre ces limitations, ce projet de Doctorat fut dédié à la conjugaison régiosélective de PEG sur l'extrémité terminale du CS, soit à la formation de copolymère en blocs CS-b-PEG. Pour ce faire, une nouvelle chimie de conjugaison en condition aqueuse a été développée : la Thioacétylation. Cette chimie, normalement pratiquée en conditions organiques, s'est trouvée être efficace dans l'eau par catalyse acide. Nous avons ainsi poursuivi les travaux de Jencks *et al.* qui ont détaillé le mécanisme d'addition de thiols sur les carbonyles en conditions aqueuses, en obtenant la stabilisation de ces structures en concentrant le milieu réactionnel par déshydratation. Cette méthode nous a permis de synthétiser un nouveau copolymère en bloc, le CS-b-PEG₂, qui fut engagé dans la formation de polyplexes ayant une structure micellaire, les « block ionomer complexes » (BICs). Ce fut la première fois que de telles structures furent publiées dans une revue scientifique.

Les BICs s'assemblent spontanément pour former des structures micellaires, structures dans lesquelles le PEG pointe vers la surface des nanoparticules. Comme évoqué dans le Chapitre 2, les BICs ne sont pas des structures figées comme peuvent l'être les lipoplexes, mais sont davantage des structures mobiles qui se réarrangent en permanence en fonction des échanges

intermoléculaires liés à leur environnement. Le sang comportant une concentration saline importante ainsi que de nombreuses protéines, tous deux susceptibles de porter atteinte à l'intégrité des BICs, l'idée de figer le cœur des structures de ces nanoparticules de manière réversible *via* des ponts disulfures permettrait d'augmenter leur stabilité dans la circulation sanguine.

Bien que l'objectif principal de cette thèse ait été atteint à l'issu du premier article, la méthode de conjugaison par thioacétylation telle que proposée initialement présente toutefois quelques limitations : (1) ce procédé s'effectuant à pH très bas, toute molécule sensible (fluorophores, ligands, etc.) introduite dans ce procédé sera dégradée par hydrolyse acide; (2) la stabilisation de la forme finale en tant que thioacétal nécessite deux attaques de thiols successives, mécanisme dont l'efficacité est limitée lorsque des substituants volumiques sont engagés dans la réaction; (3) la transformation des aldéhydes terminaux des chaînes de CS n'étant pas totale, la purification des copolymères en blocs s'est avérée très délicate, notamment à cause de la polydispersité du CS. L'idée principale de ce projet étant l'obtention de structures uniformes et ce de manière efficace, il nous a fallu revoir ce procédé.

Ainsi, à la place d'engager d'imposantes structures (potentiellement fonctionnalisées avec des groupements sensibles) dans le processus de thioacétylation, un petit linker trivalent portant trois fonctions thiols, le Triskelion, a été pensé afin d'activer l'extrémité du CS dans un premier temps et de lui permettre tout type de conjugaison ultérieure dans des conditions plus douces. Ainsi le Triskelion, portant un crochet-thiol, a été conjugué de manière efficace en bout de chaîne du CS en une seule étape, au travers d'un mécanisme intramoléculaire. L'extrémité thiol restante des conjugués CS-b-Triskelion a alors été utilisée pour habiller la surface de particules magnétiques *via* déplacement de ponts disulfures. C'est la première fois que le greffage labile d'un CS sur une surface, *via* son extrémité, est proposé dans la littérature.

L'activation de l'extrémité du CS par le Triskelion correspond non-seulement à l'amélioration du procédé initial de thioacétylation, mais peut être également considérée comme un nouveau procédé de conjugaison à part entière. En tant que toute nouvelle approche, l'activation du CS pourrait être améliorée notamment en modifiant la structure du linker trivalent (Figure 7.1). En effet, le Triskelion (Figure 7.1 – structure 1) possédant trois fonctions thiols, un crochet et une extrémité thiol située au bout d'un espaceur, il serait acceptable de protéger cette dernière entité (Figure 7.1

– structure 2), même s’il a été démontré qu’elle ne réagissait pas sur l’aldéhyde terminal du CS. Une autre amélioration serait d’augmenter la taille de l’espaceur (Figure 7.1 – structure 3) pour acquérir davantage de flexibilité et ainsi augmenter l’efficacité de toute transformation ultérieure, par déplacement de pont disulfure ou par addition de Michael. De plus, pour des raisons de solubilité, la formation du conjugué CS-b-Triskelion se faisant avec du méthanol comme co-solvant, le fait d’insérer une courte chaîne de PEG au bout du Triskelion (Figure 7.1 – structure 4) permettrait d’augmenter son caractère hydrophile et de réaliser la conjugaison uniquement en conditions aqueuses.

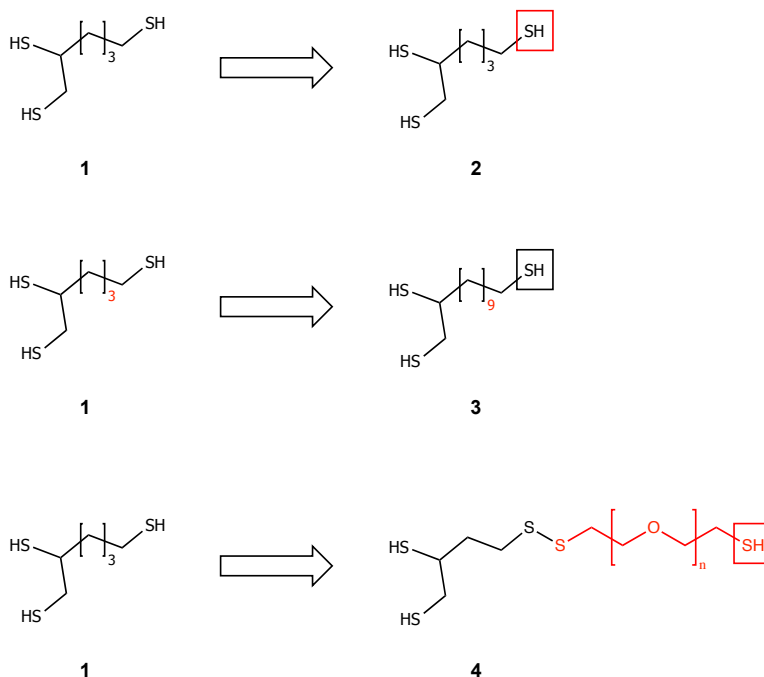


Figure 7.1 : Modifications du Triskelion proposées afin d’améliorer le procédé d’activation terminale du CS. La protection sélective de l’extrémité thiol du Triskelion (**1**), celle qui n’est pas destinée à être engagée avec le CS, permettrait de favoriser l’attaque du crochet-thiol sur l’aldéhyde du mannose terminal. Une fois le CS activé par le Triskelion, cette extrémité serait déprotégée pour permettre d’autres conjugaisons. La flexibilité de l’espaceur étant primordiale quant au succès des futures réactions, le fait d’augmenter sa longueur (**2**) permettrait d’en accroître l’efficacité. Enfin, le fait de conjuguer régiosélectivement un PEG de petite taille au bout du Triskelion permettrait de d’effectuer l’activation du CS en conditions aqueuses uniquement.

Dans de futures études potentielles, les conjugués CS-b-Triskelion pourront être engagés avec du PEG afin de former des BICs. L’avantage de cette technique est que le PEG pourra être lié au CS par ponts disulfures ou par addition de Michael, fournissant respectivement des conjugués labiles

ou non. En tant que système de livraison d'AN, l'introduction d'un pont disulfure est particulièrement intéressante du fait que ce dernier peut être clivé par les conditions réductrices de l'endosome. Le fait que le PEG se clive dans la vésicule endosomale provoquerait la rupture de sa membrane par différence de pression osmotique et permettrait ainsi de libérer l'AN dans le cytoplasme plus facilement.

Une autre application possible aux conjugués CS-b-Triskelion-b-PEG serait leur utilisation pour recouvrir des nanoparticules par interactions électrostatiques, tel que décrit dans la Figure 7.2. Des nanoparticules chargées positivement qui ont été recouvertes par de l'AN (chargé négativement) *via* interactions électrostatiques vont pouvoir être protégées par l'ajout de copolymère CS-b-Triskelion-b-PEG. En effet, ce dernier servirait à faire un dernier recouvrement de surface, composé de deux couches : la première correspondant au CS liée de façon électrostatique à l'AN et la seconde étant le PEG qui permettrait de protéger toute la structure dans la circulation sanguine.

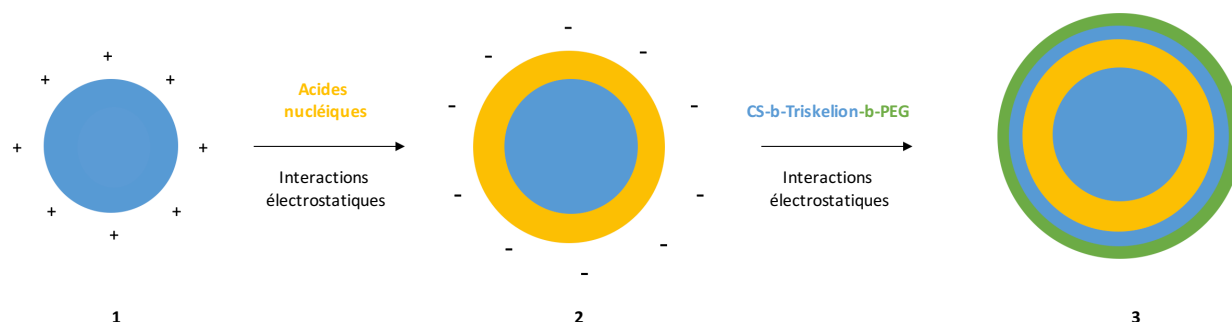


Figure 7.2 : Représentation schématique de la fonctionnalisation couche par couche de particules cationiques préformées. Des particules chargées positivement (1) seraient recouvertes *via* interactions électrostatiques par de l'AN (siRNA et/ou mRNA et/ou pDNA, etc.) (2). Les particules ainsi obtenues pourront alors être protégées dans la circulation sanguine par l'ajout d'une couche de copolymère sur leur surface, toujours par interactions électrostatiques (3).

Cette nouvelle chimie de conjugaison qu'est la thioacétylation; et plus particulièrement le procédé d'activation de l'extrémité terminale du CS par le Triskelion sont de nouveaux outils qui offrent de nouvelles perspectives pour les applications biomédicales à base de CS, telles que des modifications de surfaces et autres formations de copolymères en blocs *via* des liaisons labiles/non-labiles.

BIBLIOGRAPHIE

Aiuti, A., Bacchetta, R., Seger, R., Villa, A., & Cavazzana-Calvo, M. (2012). Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2. *Current Opinion in Immunology*, 24(5), 585-591. doi:10.1016/j.coi.2012.07.012

Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*, 11(4), 671-681. doi:10.1208/s12248-009-9143-y

Alameh, M., Dejesus, D., Jean, M., Darras, V., Thibault, M., Lavertu, M., . . . Merzouki, A. (2012). Low molecular weight chitosan nanoparticulate system at low N:P ratio for nontoxic polynucleotide delivery. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1399-1414. doi:10.2147/ijn.s26571

Allan, G. G., & Peyron, M. (1995a). Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277(2), 257-272. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00207-A](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(95)00207-A)

Allan, G. G., & Peyron, M. (1995b). Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277(2), 273-282. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00208-B](http://dx.doi.org/10.1016/0008-6215(95)00208-B)

Allen, C., Dos Santos, N., Gallagher, R., Chiu, G. N., Shu, Y., Li, W. M., . . . Bally, M. B. (2002). Controlling the physical behavior and biological performance of liposome formulations through use of surface grafted poly(ethylene glycol). *Bioscience Reports*, 22(2), 225-250.

Aranaz, I., Harris, R., & Heras, A. (2010). Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Current Organic Chemistry*, 14(3), 308-330. doi:10.2174/138527210790231919

Atha, D. H., & Ingham, K. C. (1981). Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *Journal of Biological Chemistry*, 256(23), 12108-12117.

Axson, J. L., Takahashi, K., De Haan, D. O., & Vaida, V. (2010). Gas-phase water-mediated equilibrium between methylglyoxal and its geminal diol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6687-6692. doi:10.1073/pnas.0912121107

Azevedo, E. P., Santhana Mariappan, S. V., & Kumar, V. (2012). Preparation and characterization of chitosans carrying aldehyde functions generated by nitrogen oxides. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 1925-1932. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.090>

Bakeev, K. N., Izumrudov, V. A., Kuchanov, S. I., Zezin, A. B., & Kabanov, V. A. (1992). Kinetics and mechanism of interpolyelectrolyte exchange and addition reactions. *Macromolecules*, 25(17), 4249-4254. doi:10.1021/ma00043a003

Banfi, D., & Patiny, L. (2008). <http://www.nmrdb.org/> Resurrecting and processing NMR spectra on-line. *Chimia*, 62(4), 280-281. doi:10.2533/chimia.2008.280

Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J., & Stolnik, S. (2014). Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge. *Molecular Pharmaceutics*, 11(12), 4363-4373. doi:10.1021/mp500439c

Barnett, R. E., & Jencks, W. P. (1967). Base-catalyzed hemithioacetal decomposition at a diffusion-controlled rate. *Journal of the American Chemical Society*, 89(23), 5963-5964. doi:10.1021/ja00999a047

Bax, A., Farley, K. A., & Walker, G. S. (1996). Increased HMBC Sensitivity for Correlating Poorly Resolved Proton Multiplets to Carbon-13 Using Selective or Semi-selective Pulses. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 119(1), 134-138. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/jmra.1996.0063>

Bell, R. (1966). The reversible hydration of carbonyl compounds. *Advances in Physical Organic Chemistry*, 4, 1-29.

Benediktsdottir, B. E., Sorensen, K. K., Thygesen, M. B., Jensen, K. J., Gudjonsson, T., Baldursson, O., & Masson, M. (2012). Regioselective fluorescent labeling of N,N,N-trimethyl chitosan via oxime formation. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1273-1280. doi:10.1016/j.carbpol.2012.06.070

Bentley, M. D., Roberts, M. J., & Harris, J. M. (1998). Reductive amination using poly(ethylene glycol) acetaldehyde hydrate generated in situ: applications to chitosan and lysozyme. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(11), 1446-1449. doi:10.1021/js980064w

Beyerle, A., Irmeler, M., Beckers, J., Kissel, T., & Stoeger, T. (2010). Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications. *Molecular Pharmaceutics*, 7(3), 727-737. doi:10.1021/mp900278x

Beyerle, A., Merkel, O., Stoeger, T., & Kissel, T. (2010). PEGylation affects cytotoxicity and cell-compatibility of poly(ethylene imine) for lung application: structure-function relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(2), 146-154. doi:10.1016/j.taap.2009.10.001

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(16), 7297-7301.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., . . . Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 365(6447), 666-669. doi:10.1038/365666a0

Burfield, D. R. (1982). Deperoxidation of ethers. A novel application of self-indicating molecular sieves. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(20), 3821-3824. doi:10.1021/jo00141a003

Buschmann, M. D., Merzouki, A., Lavertu, M., Thibault, M., Jean, M., & Darras, V. (2013). Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1234-1270. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.005>

Campaigne, E. (1961). CHAPTER 14 - Addition of thiols or hydrogen sulfide to carbonyl compounds. Dans N. Kharasch (édit.), *Organic Sulfur Compounds* (p. 134-145): Pergamon.

Cao, H., Molday, R. S., & Hu, J. (2011). Gene therapy: light is finally in the tunnel. *Protein Cell*, 2(12), 973-989. doi:10.1007/s13238-011-1126-y

Caraballo, R., Dong, H., Ribeiro, J. P., Jiménez-Barbero, J., & Ramström, O. (2010). Direct STD NMR Identification of β -Galactosidase Inhibitors from a Virtual Dynamic Hemithioacetal System. *Angewandte Chemie*, 122(3), 599-603. doi:10.1002/ange.200903920

Casals, E., Pfaller, T., Duschl, A., Oostingh, G. J., & Puentes, V. (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*, 4(7), 3623-3632. doi:10.1021/nn901372t

Casettari, L., & Illum, L. (2014). Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*, 190, 189-200. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.003>

Casettari, L., Vllasaliu, D., Castagnino, E., Stolnik, S., Howdle, S., & Illum, L. (2012). PEGylated chitosan derivatives: Synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(5), 659-685. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.10.001>

Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., . . . Leboulch, P. (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*, 467(7313), 318-322. doi:10.1038/nature09328

Cedervall, T., Lynch, I., Foy, M., Berggard, T., Donnelly, S. C., Cagney, G., . . . Dawson, K. A. (2007). Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angewandte Chemie, International Edition in English*, 46(30), 5754-5756. doi:10.1002/anie.200700465

Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., . . . Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2050-2055. doi:10.1073/pnas.0608582104

Chanan-Khan, A., Szebeni, J., Savay, S., Liebes, L., Rafique, N. M., Alving, C. R., & Muggia, F. M. (2003). Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Annals of Oncology*, 14(9), 1430-1437.

Chevrier, A., Hoemann, C. D., Sun, J., & Buschmann, M. D. (2011). Temporal and spatial modulation of chondrogenic foci in subchondral microdrill holes by chitosan-glycerol phosphate/blood implants. *Osteoarthritis and Cartilage*, 19(1), 136-144. doi:10.1016/j.joca.2010.10.026

Claridge, T. D. W. (1999). *High-resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*: Elsevier.

Claustre, S., Bringaud, F., Azéma, L., Baron, R., Périé, J., & Willson, M. (1999). An easy stereospecific synthesis of 1-amino-2,5-anhydro-1-deoxy-d-mannitol and arylamino derivatives.

Carbohydrate Research, 315(3–4), 339–344. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00040-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00040-3)

Cohen Stuart, M. A., Hofs, B., Voets, I. K., & de Keizer, A. (2005). Assembly of polyelectrolyte-containing block copolymers in aqueous media. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(1–2), 30–36. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.04.004>

Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780–792. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>

Crossland, R. K., & Servis, K. L. (1970). Facile synthesis of methanesulfonate esters. *The Journal of Organic Chemistry*, 35(9), 3195–3196. doi:10.1021/jo00834a087

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36(8), 981–1014. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>

Dautzenberg, H., & Jaeger, W. (2002). Effect of charge density on the formation and salt stability of polyelectrolyte complexes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203(14), 2095–2102. doi:10.1002/1521-3935(200210)203:14<2095::AID-MACP2095>3.0.CO;2-9

Davis, M. E. (2009). The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle: From Concept to Clinic. *Molecular Pharmaceutics*, 6(3), 659–668. doi:10.1021/mp900015y

de Gennes, P. G. (1980). Conformations of Polymers Attached to an Interface. *Macromolecules*, 13(5), 1069–1075. doi:10.1021/ma60077a009

de Gennes, P. G. (1985). Wetting: statics and dynamics. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 827–863.

Delaittre, G., Greiner, A. M., Pauloehrl, T., Bastmeyer, M., & Barner-Kowollik, C. (2012). Chemical approaches to synthetic polymer surface biofunctionalization for targeted cell adhesion using small binding motifs. *Soft Matter*, 8(28), 7323–7347. doi:10.1039/C2SM07407A

Digiusto, D. L., & Kiem, H. P. (2012). Current translational and clinical practices in hematopoietic cell and gene therapy. *Cytotherapy*, 14(7), 775–790. doi:10.3109/14653249.2012.694420

Dinh, A.-T., Pangarkar, C., Theofanous, T., & Mitragotri, S. (2007). Understanding Intracellular Transport Processes Pertinent to Synthetic Gene Delivery via Stochastic Simulations and Sensitivity Analyses. *Biophysical Journal*, 92(3), 831–846. doi:10.1529/biophysj.106.095521

Dos Santos, N., Allen, C., Doppen, A. M., Anantha, M., Cox, K. A., Gallagher, R. C., . . . Bally, M. B. (2007). Influence of poly(ethylene glycol) grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(6), 1367–1377. doi:10.1016/j.bbamem.2006.12.013

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213). doi:10.1126/science.1258096

Drew, K. N., Zajicek, J., Bondo, G., Bose, B., & Serianni, A. S. (1998). ¹³C-labeled aldopentoses: detection and quantitation of cyclic and acyclic forms by heteronuclear 1D and 2D NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 307(3–4), 199-209. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00040-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00040-8)

Duan, Y., Guan, X., Ge, J., Quan, D., Zhuo, Y., Ye, H., & Shao, T. (2008). Cationic nanopolymers mediated IKK β targeting siRNA inhibit the proliferation of human Tenon's capsule fibroblasts in vitro. *Molecular Vision*, 14, 2616-2628.

Dutta, P. K., Rinki, K., & Dutta, J. (2011). Chitosan: A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds. Dans R. Jayakumar, M. Prabaharan & A. R. A. Muzzarelli (édit.), *Chitosan for Biomaterials II* (p. 45-79). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Eloranta, T. O., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., & Hyvonen, T. (1990). Aminoxy analogues of spermidine as inhibitors of spermine synthase and substrates of hepatic polyamine acetylating activity. *Journal of Biochemistry*, 108(4), 593-598.

Erlandsson, M., & Hällbrink, M. (2005). Metallic Zinc Reduction of Disulfide Bonds between Cysteine Residues in Peptides and Proteins. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 11(4), 261-265. doi:10.1007/s10989-005-8113-1

Fei, X., & Gu, Y. (2009). Progress in modifications and applications of fluorescent dye probe. *Progress in Natural Science*, 19(1), 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.06.004>

Fendler, J. H. (1996). *The colloidal domain: Where physics, chemistry, biology, and technology meet*. By D. Fennell Evans and Hakan Wennerström. VCH Publishers, New York 1994, XXXII, 515 pp., hardcover, DM 980, ISBN 1-56081-525-6 (vol. 8): WILEY-VCH Verlag GmbH.

Filion, D., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2007). Ionization and solubility of chitosan solutions related to thermosensitive chitosan/glycerol-phosphate systems. *Biomacromolecules*, 8(10), 3224-3234. doi:10.1021/bm700520m

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888

Fournier, L., Lamaty, G., Natat, A., & Roque, J. P. (1975). Addition des thiols sur les cétones-III: Reinvestigation du mécanisme de l'addition du mercapto-2/ethanol. *Tetrahedron*, 31(8), 1025-1029. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(75\)80122-0](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(75)80122-0)

Fuller, J. E., Zugates, G. T., Ferreira, L. S., Ow, H. S., Nguyen, N. N., Wiesner, U. B., & Langer, R. S. (2008). Intracellular delivery of core-shell fluorescent silica nanoparticles. *Biomaterials*, 29(10), 1526-1532. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.025>

Furrer, J. (2010). A robust, sensitive, and versatile HMBC experiment for rapid structure elucidation by NMR: IMPACT-HMBC. *Chemical Communications*, 46(19), 3396-3398. doi:10.1039/C000964D

Gao, X., Kim, K. S., & Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS Journal*, 9(1), E92-104. doi:10.1208/aapsj0901009

Garcia-Fuentes, M., & Alonso, M. J. (2012). Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? *Journal of Controlled Release*, 161(2), 496-504. doi:10.1016/j.jconrel.2012.03.017

Gary, D. J., Puri, N., & Won, Y. Y. (2007). Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. *Journal of Controlled Release*, 121(1-2), 64-73. doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.021

Germershaus, O., Mao, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., & Kissel, T. (2008). Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: Establishment of structure-activity relationships in vitro. *Journal of Controlled Release*, 125(2), 145-154. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.013>

Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R., & Selvin, P. R. (1999). A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry*, 273(1), 73-80. doi:<http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4203>

Gilgenkrantz, S. (2007). Thérapie génique Espoir ou illusion? *Medecine/Sciences*, 23, 221-222.

Goddard, J. M., & Hotchkiss, J. H. (2007). Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 698-725. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.04.002>

Gori, J. L., Hsu, P. D., Maeder, M. L., Shen, S., Welstead, G. G., & Bumcrot, D. (2015). Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy. *Human Gene Therapy*, 26(7), 443-451. doi:10.1089/hum.2015.074

Gorochovceva, N., & Makuška, R. (2004). Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol) graft copolymers. *European Polymer Journal*, 40(4), 685-691. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2003.12.005>

Guo, X., & Huang, L. (2012). Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery. *Accounts of Chemical Research*, 45(7), 971-979. doi:10.1021/ar200151m

Harada, A., & Kataoka, K. (1995). Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments. *Macromolecules*, 28(15), 5294-5299. doi:10.1021/ma00119a019

Harada, A., & Kataoka, K. (1999). Chain Length Recognition: Core-Shell Supramolecular Assembly from Oppositely Charged Block Copolymers. *Science*, 283(5398), 65-67. doi:10.1126/science.283.5398.65

- Harada-Shiba, M., Yamauchi, K., Harada, A., Takamisawa, I., Shimokado, K., & Kataoka, K. (2002). Polyion complex micelles as vectors in gene therapy--pharmacokinetics and in vivo gene transfer. *Gene Therapy*, 9(6), 407-414. doi:10.1038/sj.gt.3301665
- Harder, P., Grunze, M., Dahint, R., Whitesides, G. M., & Laibinis, P. E. (1998). Molecular Conformation in Oligo(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Silver Surfaces Determines Their Ability To Resist Protein Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(2), 426-436. doi:10.1021/jp972635z
- Harris, J. M., & Chess, R. B. (2003). Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2(3), 214-221. doi:10.1038/nrd1033
- Harris, J. M., Struck, E. C., Case, M. G., Paley, M. S., Yalpani, M., Van Alstine, J. M., & Brooks, D. E. (1984). Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*, 22(2), 341-352. doi:10.1002/pol.1984.170220207
- Hatakeyama, H., Akita, H., & Harashima, H. (2011). A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 152-160. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.001>
- Haurwitz, R. E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K., & Doudna, J. A. (2010). Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. *Science*, 329(5997), 1355-1358. doi:10.1126/science.1192272
- Heller, L. C., Ugen, K., & Heller, R. (2005). Electroporation for targeted gene transfer. *Expert Opin Drug Deliv*, 2(2), 255-268. doi:10.1517/17425247.2.2.255
- Hesselink, F. T., Vrij, A., & Overbeek, J. T. G. (1971). Theory of the stabilization of dispersions by adsorbed macromolecules. II. Interaction between two flat particles. *The Journal of Physical Chemistry*, 75(14), 2094-2103. doi:10.1021/j100683a005
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrières, J., Versali, M. F., & Rinaudo, M. (2000). Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules*, 1(4), 746-751. doi:10.1021/bm000070y
- Hirsch, M. L., Agbandje-McKenna, M., & Samulski, R. J. (2010). Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus. *Molecular Therapy*, 18(1), 6-8. doi:10.1038/mt.2009.280
- Hoemann, C. D., Chen, G., Marchand, C., Tran-Khanh, N., Thibault, M., Chevrier, A., . . . El-Gabalawy, H. (2010). Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. *American Journal of Sports Medicine*, 38(9), 1845-1856. doi:10.1177/0363546510369547
- Hu, L., Sun, Y., & Wu, Y. (2013). Advances in chitosan-based drug delivery vehicles. *Nanoscale*, 5(8), 3103-3111. doi:10.1039/C3NR00338H

Hu, Y., Jiang, H., Xu, C., Wang, Y., & Zhu, K. (2005). Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-g-chitosan with water- and organosolubility. *Carbohydrate Polymers*, 61(4), 472-479. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.06.022>

Huang, M., Fong, C. W., Khor, E., & Lim, L. Y. (2005). Transfection efficiency of chitosan vectors: effect of polymer molecular weight and degree of deacetylation. *Journal of Controlled Release*, 106(3), 391-406. doi:10.1016/j.jconrel.2005.05.004

Isbell, H. S. W., C.W. R. (1967). Deuterium Isotope Effects in a-b Pyranose and Pyranose-Furanose Interconversions. *JOURNAL OF RESEARCH of the National Bureau of Standards - A. Physics and Chemistry*, 71A(2), 137-148.

Ishida, T., & Kiwada, H. (2013). Anti-polyethyleneglycol antibody response to PEGylated substances. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(6), 889-891.

Ishihara, T., Takeda, M., Sakamoto, H., Kimoto, A., Kobayashi, C., Takasaki, N., . . . Mizushima, T. (2009). Accelerated Blood Clearance Phenomenon Upon Repeated Injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26(10), 2270-2279. doi:10.1007/s11095-009-9943-x

Itaka, K., & Kataoka, K. (2009). Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 475-483. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.019>

Itaka, K., Yamauchi, K., Harada, A., Nakamura, K., Kawaguchi, H., & Kataoka, K. (2003). Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials*, 24(24), 4495-4506.

Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Methot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. (2009). Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene Therapy*, 16(9), 1097-1110. doi:10.1038/gt.2009.60

Jiang, H.-L., Kim, Y.-K., Arote, R., Nah, J.-W., Cho, M.-H., Choi, Y.-J., . . . Cho, C.-S. (2007). Chitosan-graft-polyethylenimine as a gene carrier. *Journal of Controlled Release*, 117(2), 273-280. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.025>

Jiang, X., Dai, H., Leong, K. W., Goh, S. H., Mao, H. Q., & Yang, Y. Y. (2006). Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions. *Journal of Gene Medicine*, 8(4), 477-487. doi:10.1002/jgm.868

Judge, A., McClintock, K., Phelps, J. R., & MacLachlan, I. (2006). Hypersensitivity and Loss of Disease Site Targeting Caused by Antibody Responses to PEGylated Liposomes. *Molecular Therapy*, 13(2), 328-337.

Kabanov, A. V., Bronich, T. K., Kabanov, V. A., Yu, K., & Eisenberg, A. (1996). Soluble Stoichiometric Complexes from Poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) Cations and Poly(ethylene

oxide)-block-polymethacrylate Anions. *Macromolecules*, 29(21), 6797-6802. doi:10.1021/ma960120k

Kabanov, A. V., & Kabanov, V. A. (1995). DNA Complexes with Polycations for the Delivery of Genetic Material into Cells. *Bioconjugate Chemistry*, 6(1), 7-20. doi:10.1021/bc00031a002

Kabanov, V. A., & Kabanov, A. V. (1998). Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: physico-chemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30(1-3), 49-60.

Kalia, J., & Raines, R. T. (2008). Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(39), 7523-7526. doi:10.1002/anie.200802651

Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P. M., Radovic-Moreno, A. F., & Farokhzad, O. C. (2012). Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2971-3010. doi:10.1039/c2cs15344k

Karlsson, J., Ungell, A.-L., Gråsjö, J., & Artursson, P. (1999). Paracellular drug transport across intestinal epithelia: influence of charge and induced water flux. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 47-56. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987\(99\)00041-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-0987(99)00041-X)

Kasaai, M. R. (2009). Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1667-1676. doi:10.1021/jf803001m

Kean, T., & Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(1), 3-11. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>

Kim, H. J., Kim, A., Miyata, K., & Kataoka, K. (2016). Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 104, 61-77. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.011>

Kim, T.-H., Jiang, H.-L., Jere, D., Park, I.-K., Cho, M.-H., Nah, J.-W., . . . Cho, C.-S. (2007). Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science*, 32(7), 726-753. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.001>

Kjellander, R., & Florin, E. (1981). Water structure and changes in thermal stability of the system poly(ethylene oxide)-water. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 77(9), 2053-2077. doi:10.1039/F19817702053

Klausner, E. A., Zhang, Z., Chapman, R. L., Multack, R. F., & Volin, M. V. (2010). Ultrapure chitosan oligomers as carriers for corneal gene transfer. *Biomaterials*, 31(7), 1814-1820. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.031>

Kohman, R. (2009). *Synthesis and application of biomaterials containing the 1,3,5-triazaadamantane moiety or functionalized alginate*. (Dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).

- Koping-Hoggard, M., Varum, K. M., Issa, M., Danielsen, S., Christensen, B. E., Stokke, B. T., & Artursson, P. (2004). Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. *Gene Therapy*, 11(19), 1441-1452. doi:10.1038/sj.gt.3302312
- Krężel, A., Latajka, R., Bujacz, G. D., & Bal, W. (2003). Coordination Properties of Tris(2-carboxyethyl)phosphine, a Newly Introduced Thiol Reductant, and Its Oxide. *Inorganic Chemistry*, 42(6), 1994-2003. doi:10.1021/ic025969y
- Kumar, S. R. P., Markusic, D. M., Biswas, M., High, K. A., & Herzog, R. W. (2016). Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development*, 3, 16034. doi:10.1038/mtm.2016.34
- Kumar, V., Sharma, V. K., & Kalonia, D. S. (2009). Effect of polyols on polyethylene glycol (PEG)-induced precipitation of proteins: Impact on solubility, stability and conformation. *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 38-43. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.037>
- Kunzmann, A., Andersson, B., Thurnherr, T., Krug, H., Scheynius, A., & Fadeel, B. (2011). Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1810(3), 361-373. doi:10.1016/j.bbagen.2010.04.007
- Labat-Moleur, F., Steffan, A. M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., . . . Behr, J. P. (1996). An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Therapy*, 3(11), 1010-1017.
- Lächelt, U., & Wagner, E. (2015). Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chemical Reviews*, 115(19), 11043-11078. doi:10.1021/cr5006793
- Larpent, C. (1995). Propriétés des agents tensioactifs. *Techniques de l'ingénieur Constantes chimiques, base documentaire : TIB337DUO*(ref. article : k342).
- Larsson, M., Huang, W.-C., Hsiao, M.-H., Wang, Y.-J., Nydén, M., Chiou, S.-H., & Liu, D.-M. (2013). Biomedical applications and colloidal properties of amphiphilically modified chitosan hybrids. *Progress in Polymer Science*, 38(9), 1307-1328. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.06.009>
- Lavertu, M., Darras, V., & Buschmann, M. D. (2012). Kinetics and efficiency of chitosan reacylation. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1192-1198. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.096>
- Lavertu, M., Méthot, S., Tran-Khanh, N., & Buschmann, M. D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 27(27), 4815-4824. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.029>

- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., . . . Gupta, A. (2003). A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32(6), 1149-1158. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00155-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00155-9)
- Layek, B., Haldar, M. K., Sharma, G., Lipp, L., Mallik, S., & Singh, J. (2014). Hexanoic Acid and Polyethylene Glycol Double Grafted Amphiphilic Chitosan for Enhanced Gene Delivery: Influence of Hydrophobic and Hydrophilic Substitution Degree. *Molecular Pharmaceutics*, 11(3), 982-994. doi:10.1021/mp400633r
- Lebouc, F., Dez, I., Desbrières, J., Picton, L., & Madec, P.-J. (2005). Different ways for grafting ester derivatives of poly(ethylene glycol) onto chitosan: related characteristics and potential properties. *Polymer*, 46(3), 639-651. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2004.11.104>
- Lee, J. H., Lee, H. B., & Andrade, J. D. (1995). Blood compatibility of polyethylene oxide surfaces. *Progress in Polymer Science*, 20(6), 1043-1079. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700\(95\)00011-4](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6700(95)00011-4)
- Lee, S. J., Huh, M. S., Lee, S. Y., Min, S., Lee, S., Koo, H., . . . Kwon, I. C. (2012). Tumor-Homing Poly-siRNA/Glycol Chitosan Self-Cross-Linked Nanoparticles for Systemic siRNA Delivery in Cancer Treatment. *Angewandte Chemie International Edition*, 51(29), 7203-7207. doi:10.1002/anie.201201390
- Leong, K. W., Mao, H. Q., Truong-Le, V. L., Roy, K., Walsh, S. M., & August, J. T. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, 53(1-3), 183-193.
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184. doi:10.1039/C4TB00027G
- Li, T. S. C., Yawata, T., & Honke, K. (2014). Efficient siRNA delivery and tumor accumulation mediated by ionically cross-linked folic acid–poly(ethylene glycol)–chitosan oligosaccharide lactate nanoparticles: For the potential targeted ovarian cancer gene therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 48-61. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.10.011>
- Li, W., & Szoka, F. C., Jr. (2007). Lipid-based nanoparticles for nucleic acid delivery. *Pharmaceutical Research*, 24(3), 438-449. doi:10.1007/s11095-006-9180-5
- Li, Y., Wang, J., Wientjes, M. G., & Au, J. L. S. (2012). Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(1), 29-39. doi:10.1016/j.addr.2011.04.006
- Liang, H. D., Lu, Q. L., Xue, S. A., Halliwell, M., Kodama, T., Cosgrove, D. O., . . . Blomley, M. J. (2004). Optimisation of ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in skeletal muscle cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 30(11), 1523-1529. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.021

- Lienhard, G. E., & Jencks, W. P. (1966). Thiol Addition to the Carbonyl Group. Equilibria and Kinetics1. *Journal of the American Chemical Society*, 88(17), 3982-3995. doi:10.1021/ja00969a017
- Lin, W. J., Chen, T. D., Liu, C. W., Chen, J. L., & Chang, F. H. (2011). Synthesis of lactobionic acid-grafted-pegylated-chitosan with enhanced HepG2 cells transfection. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 898-904. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.072>
- Liu, F., Song, Y., & Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(7), 1258-1266. doi:10.1038/sj.gt.3300947
- Liu, X. D., Tokura, S., Nishi, N., & Sakairi, N. (2003). A novel method for immobilization of chitosan onto nonporous glass beads through a 1,3-thiazolidine linker. *Polymer*, 44(4), 1021-1026. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00879-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00879-0)
- Liu, Z., Zhang, Z., Zhou, C., & Jiao, Y. (2010). Hydrophobic modifications of cationic polymers for gene delivery. *Progress in Polymer Science*, 35(9), 1144-1162. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.007>
- LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., & Selvamurugan, N. (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 151, 172-188. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049>
- Los, J. M., Simpson, L. B., & Wiesner, K. (1956). The Kinetics of Mutarotation of D-Glucose with Consideration of an Intermediate Free-aldehyde Form. *Journal of the American Chemical Society*, 78(8), 1564-1568. doi:10.1021/ja01589a017
- Lu, B., Wang, C.-F., Wu, D.-Q., Li, C., Zhang, X.-Z., & Zhuo, R.-X. (2009). Chitosan based oligoamine polymers: Synthesis, characterization, and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 137(1), 54-62. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.03.004>
- Lumry, R., Smith, E. L., & Glantz, R. R. (1951). Kinetics of Carboxypeptidase Action. I. Effect of Various Extrinsic Factors on Kinetic Parameters1. *Journal of the American Chemical Society*, 73(9), 4330-4340. doi:10.1021/ja01153a090
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., & Dawson, K. A. (2008). Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(38), 14265-14270. doi:10.1073/pnas.0805135105
- Ma, P. L., Buschmann, M. D., & Winnik, F. M. (2010). Complete physicochemical characterization of DNA/chitosan complexes by multiple detection using asymmetrical flow field-flow fractionation. *Analytical Chemistry*, 82(23), 9636-9643. doi:10.1021/ac100711j
- Ma, P. L., Lavertu, M., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). New Insights into Chitosan–DNA Interactions Using Isothermal Titration Microcalorimetry. *Biomacromolecules*, 10(6), 1490-1499. doi:10.1021/bm900097s

- MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P. (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, 56(1-3), 259-272. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00097-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00097-2)
- Malmö, J., Sorgard, H., Varum, K. M., & Strand, S. P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *Journal of Controlled Release*, 158(2), 261-268. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.012
- Mao, H. Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., . . . Leong, K. W. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 70(3), 399-421.
- Maple, S. R., & Allerhand, A. (1987). Detailed tautomeric equilibrium of aqueous D-glucose. Observation of six tautomers by ultrahigh resolution carbon-13 NMR. *Journal of the American Chemical Society*, 109(10), 3168-3169. doi:10.1021/ja00244a063
- Matsumoto, S., Christie, R. J., Nishiyama, N., Miyata, K., Ishii, A., Oba, M., . . . Kataoka, K. (2009). Environment-Responsive Block Copolymer Micelles with a Disulfide Cross-Linked Core for Enhanced siRNA Delivery. *Biomacromolecules*, 10(1), 119-127. doi:10.1021/bm800985e
- Mayer, L. D., Tai, L. C., Ko, D. S., Masin, D., Ginsberg, R. S., Cullis, P. R., & Bally, M. B. (1989). Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Research*, 49(21), 5922-5930.
- McManus, S. P. K., A; Youso, P.D. (2012). *Brevet US n°*.
- Mintzer, M. A., & Simanek, E. E. (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical Reviews*, 109(2), 259-302. doi:10.1021/cr800409e
- Mittermeyer, G., Christine, C. W., Rosenbluth, K. H., Baker, S. L., Starr, P., Larson, P., . . . Bankiewicz, K. S. (2012). Long-Term Evaluation of a Phase 1 Study of AADC Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy*, 23(4), 377-381. doi:10.1089/hum.2011.220
- Moreira, C., Oliveira, H., Pires, L. R., Simoes, S., Barbosa, M. A., & Pego, A. P. (2009). Improving chitosan-mediated gene transfer by the introduction of intracellular buffering moieties into the chitosan backbone. *Acta Biomaterialia*, 5(8), 2995-3006. doi:10.1016/j.actbio.2009.04.021
- Morimoto, M., Nakao, M., Ishibashi, N., Shigemasa, Y., Ifuku, S., & Saimoto, H. (2011). Synthesis of novel chitosan with chitosan side chains. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 727-731. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.03.035>
- Morris, V. B., & Sharma, C. P. (2010a). Folate mediated histidine derivative of quaternised chitosan as a gene delivery vector. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1-2), 176-185. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.01.037

- Morris, V. B., & Sharma, C. P. (2010b). Folate mediated in vitro targeting of depolymerised trimethylated chitosan having arginine functionality. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348(2), 360-368. doi:10.1016/j.jcis.2010.04.090
- Murugan, K., Choonara, Y. E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L. C., & Pillay, V. (2015). Parameters and characteristics governing cellular internalization and trans-barrier trafficking of nanostructures. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2191-2206. doi:10.2147/ijn.s75615
- Na, J. H., Koo, H., Lee, S., Min, K. H., Park, K., Yoo, H., . . . Kim, K. (2011). Real-time and non-invasive optical imaging of tumor-targeting glycol chitosan nanoparticles in various tumor models. *Biomaterials*, 32(22), 5252-5261. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.076>
- Naldini, L. (2009). A Comeback for Gene Therapy. *Science*, 326(5954), 805-806. doi:10.1126/science.1181937
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1, 27. doi:10.4103/2277-9175.98152
- Ng, C. P., & Pun, S. H. (2008). A perfusable 3D cell-matrix tissue culture chamber for in situ evaluation of nanoparticle vehicle penetration and transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(6), 1490-1501. doi:10.1002/bit.21698
- Nguyen, J., & Szoka, F. C. (2012). Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? *Accounts of Chemical Research*, 45(7), 1153-1162. doi:10.1021/ar3000162
- Nguyen, S., Winnik, F. M., & Buschmann, M. D. (2009). Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydrate Polymers*, 75(3), 528-533. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.08.013>
- Nie, S. (2010). Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 5(4), 523-528. doi:10.2217/nnm.10.23
- Niebel, Y., Buschmann, M. D., Lavertu, M., & De Crescenzo, G. (2014). Combined Analysis of Polycation/ODN Polyplexes by Analytical Ultracentrifugation and Dynamic Light Scattering Reveals their Size, Refractive Index Increment, Stoichiometry, Porosity, and Molecular Weight. *Biomacromolecules*, 15(3), 940-947. doi:10.1021/bm4018148
- Nielsen, E. J., Nielsen, J. M., Becker, D., Karlas, A., Prakash, H., Glud, S. Z., . . . Howard, K. A. (2010). Pulmonary gene silencing in transgenic EGFP mice using aerosolised chitosan/siRNA nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 27(12), 2520-2527. doi:10.1007/s11095-010-0255-y
- Nimesh, S., Thibault, M. M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2010). Enhanced gene delivery mediated by low molecular weight chitosan/DNA complexes: effect of pH and serum. *Molecular Biotechnology*, 46(2), 182-196. doi:10.1007/s12033-010-9286-1
- Nishimura, S., Kohgo, O., Kurita, K., & Kuzuhara, H. (1991). Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common

organic solvents by regioselective chemical modifications. *Macromolecules*, 24(17), 4745-4748. doi:10.1021/ma00017a003

Noh, S. M., Park, M. O., Shim, G., Han, S. E., Lee, H. Y., Huh, J. H., . . . Oh, Y. K. (2010). Pegylated poly-l-arginine derivatives of chitosan for effective delivery of siRNA. *Journal of Controlled Release*, 145(2), 159-164. doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.005

Noller, C. R., Luchetti, C. A., Acton, E. M., & Bernhard, R. A. (1953). The Reaction of Methanesulfonyl Chloride with Alcohols in the Presence of Pyridine. *Journal of the American Chemical Society*, 75(15), 3851-3852. doi:10.1021/ja01111a519

Nordtveit, R. J., Vårum, K. M., & Smidsrød, O. (1996). Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydrate Polymers*, 29(2), 163-167. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617\(96\)00003-3](http://dx.doi.org/10.1016/0144-8617(96)00003-3)

Novoa-Carballal, R., & Muller, A. H. E. (2012). Synthesis of polysaccharide-b-PEG block copolymers by oxime click. *Chemical Communications*, 48(31), 3781-3783. doi:10.1039/C2CC30726J

Novoa-Carballal, R., Silva, C., Moller, S., Schnabelrauch, M., Reis, R. L., & Pashkuleva, I. (2014). Tunable nano-carriers from clicked glycosaminoglycan block copolymers. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(26), 4177-4184. doi:10.1039/C4TB00410H

Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93-102. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.10.010

Park, I. K., Kim, T. H., Park, Y. H., Shin, B. A., Choi, E. S., Chowdhury, E. H., . . . Cho, C. S. (2001). Galactosylated chitosan-graft-poly(ethylene glycol) as hepatocyte-targeting DNA carrier. *Journal of Controlled Release*, 76(3), 349-362. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00448-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00448-5)

Pathak, A., Patnaik, S., & Gupta, K. C. (2009). Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. *Biotechnology Journal*, 4(11), 1559-1572. doi:10.1002/biot.200900161

Pergushov, D. V., Muller, A. H. E., & Schacher, F. H. (2012). Micellar interpolyelectrolyte complexes. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 6888-6901. doi:10.1039/C2CS35135H

Pickenhahn, V. D., Darras, V., Dziopa, F., Biniecki, K., De Crescenzo, G., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2015). Regioselective thioacetylation of chitosan end-groups for nanoparticle gene delivery systems. *Chemical Science*, 6(8), 4650-4664. doi:10.1039/C5SC00038F

Pickenhahn, V. D., Grange, M., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2016). Regioselective Chitosan End-Group Activation: The Triskelion Approach. *Chemical Science (Submitted)*.

Pihlaja, K., & Pasanen, P. (1981). Oxathiacyclanes: preparation, structure and reactions. Dans *Ethers, Crown Ethers, Hydroxyl Groups and their Sulphur Analogues (1981)* (p. 821-858): John Wiley & Sons, Ltd.

Pinto, D., Santos, C. M., & Silva, A. M. Advanced NMR techniques for structural characterization of heterocyclic structures.

Prichystalova, H., Almonasy, N., Abdel-Mohsen, A. M., Abdel-Rahman, R. M., Fouda, M. M., Vojtova, L., . . . Jancar, J. (2014). Synthesis, characterization and antibacterial activity of new fluorescent chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 234-240. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.01.050

Ramamoorth, M., & Narvekar, A. (2015). Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(1), GE01-GE06. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394

Ren, B., Wang, M., Liu, J., Ge, J., Zhang, X., & Dong, H. (2015). Zemplen transesterification: a name reaction that has misled us for 90 years. *Green Chemistry*, 17(3), 1390-1394. doi:10.1039/C4GC02006E

Richard, I., Thibault, M., De Crescenzo, G., Buschmann, M. D., & Lavertu, M. (2013). Ionization behavior of chitosan and chitosan-DNA polyplexes indicate that chitosan has a similar capability to induce a proton-sponge effect as PEI. *Biomacromolecules*, 14(6), 1732-1740. doi:10.1021/bm4000713

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>

Romoren, K., Pedersen, S., Smistad, G., Evensen, O., & Thu, B. J. (2003). The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. *International Journal of Pharmaceutics*, 261(1-2), 115-127.

Rosenberg, S. A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R. A., Moen, R., . . . et al. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New England Journal of Medicine*, 323(9), 570-578. doi:10.1056/nejm199008303230904

Rossi, J. J. (2005). RNAi therapeutics: SNALPing siRNAs in vivo. *Gene Therapy*, 13(7), 583-584.

Saadati, R., Dadashzadeh, S., Abbasian, Z., & Soleimanjahi, H. (2013). Accelerated Blood Clearance of PEGylated PLGA Nanoparticles Following Repeated Injections: Effects of Polymer Dose, PEG Coating, and Encapsulated Anticancer Drug. *Pharmaceutical Research*, 30(4), 985-995. doi:10.1007/s11095-012-0934-y

Sahin, U., Kariko, K., & Tureci, O. (2014). mRNA-based therapeutics [mdash] developing a new class of drugs. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 13(10), 759-780. doi:10.1038/nrd4278

Saito, H., Tabeta, R., & Ogawa, K. (1987). High-resolution solid-state carbon-13 NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent carbon-13 chemical shifts. *Macromolecules*, 20(10), 2424-2430. doi:10.1021/ma00176a017

- Sander, E. G., & Jencks, W. P. (1968). Equilibria for additions to the carbonyl group. *Journal of the American Chemical Society*, 90(22), 6154-6162. doi:10.1021/ja01024a038
- Sarvaiya, J., & Agrawal, Y. K. (2015). Chitosan as a suitable nanocarrier material for anti-Alzheimer drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 454-465. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.052>
- Sashiwa, H., & Aiba, S.-i. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 29(9), 887-908. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2004.04.001>
- Satchell, D. P. N., & Satchell, R. S. (1990). Mechanisms of hydrolysis of thioacetals. *Chemical Society Reviews*, 19(1), 55-81. doi:10.1039/CS9901900055
- Schatz, C., & Lecommandoux, S. (2010). Polysaccharide-Containing Block Copolymers: Synthesis, Properties and Applications of an Emerging Family of Glycoconjugates. *Macromolecular Rapid Communications*, 31(19), 1664-1684. doi:10.1002/marc.201000267
- Schellekens, H., Hennink, W. E., & Brinks, V. (2013). The Immunogenicity of Polyethylene Glycol: Facts and Fiction. *Pharmaceutical Research*, 30(7), 1729-1734. doi:10.1007/s11095-013-1067-7
- Schubert, M. P. (1936). Compounds of thiol acids with aldehydes. *Journal of Biological Chemistry*, 114(1), 341-350.
- Schulman, E. M., Bonner, O. D., Schulman, D. R., & Laskovics, F. M. (1976). Stable hydrogen-bonded adducts of unstable polyhalogenated gem-diols. *Journal of the American Chemical Society*, 98(13), 3793-3799. doi:10.1021/ja00429a010
- Shao, J., & Tam, J. P. (1995). Unprotected Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Peptide Dendrimers with Oxime, Hydrazone, and Thiazolidine Linkages. *Journal of the American Chemical Society*, 117(14), 3893-3899. doi:10.1021/ja00119a001
- Shen, H., Jawaid, A. M., & Snee, P. T. (2009). Poly(ethylene glycol) carbodiimide coupling reagents for the biological and chemical functionalization of water-soluble nanoparticles. *ACS Nano*, 3(4), 915-923. doi:10.1021/nn800870r
- Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., & Cheng, T. (2006). Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine1. *Journal of Surgical Research*, 133(2), 185-192. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2005.12.013>
- Sieval, A. B., Thanou, M., Kotze', A. F., Verhoef, J. C., Brussee, J., & Junginger, H. E. (1998). Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 36(2), 157-165. doi:10.1016/S0144-8617(98)00009-5
- Sioud, M. (2005). On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells. *Expert Opin Drug Deliv*, 2(4), 639-651. doi:10.1517/17425247.2.4.639

- Skelley, A. M., & Mathies, R. A. (2006). Rapid on-column analysis of glucosamine and its mutarotation by microchip capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1132(1-2), 304-309. doi:10.1016/j.chroma.2006.07.082
- Stamatatos, L., Leventis, R., Zuckermann, M. J., & Silviu, J. R. (1988). Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. *Biochemistry*, 27(11), 3917-3925. doi:10.1021/bi00411a005
- Strand, S. P., Danielsen, S., Christensen, B. E., & Vårum, K. M. (2005). Influence of Chitosan Structure on the Formation and Stability of DNA–Chitosan Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules*, 6(6), 3357-3366. doi:10.1021/bm0503726
- Strand, S. P., Lelu, S., Reitan, N. K., de Lange Davies, C., Artursson, P., & Vårum, K. M. (2010). Molecular design of chitosan gene delivery systems with an optimized balance between polyplex stability and polyplex unpacking. *Biomaterials*, 31(5), 975-987. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.102>
- Suzuki, T., Ichihara, M., Hyodo, K., Yamamoto, E., Ishida, T., Kiwada, H., . . . Ishihara, H. (2014). Influence of dose and animal species on accelerated blood clearance of PEGylated liposomal doxorubicin. *International Journal of Pharmaceutics*, 476(1–2), 205-212. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.047>
- Takae, S., Miyata, K., Oba, M., Ishii, T., Nishiyama, N., Itaka, K., . . . Kataoka, K. (2008). PEG-Detachable Polyplex Micelles Based on Disulfide-Linked Block Cationomers as Bioresponsive Nonviral Gene Vectors. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), 6001-6009. doi:10.1021/ja800336v
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., & Buschmann, M. D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials*, 32(20), 4639-4646. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.03.010
- Thünemann, A., Müller, M., Dautzenberg, H., Joanny, J.-F., & Löwen, H. (2004). Polyelectrolyte Complexes. Dans M. Schmidt (édit.), *Polyelectrolytes with Defined Molecular Architecture II* (vol. 166, p. 113-171): Springer Berlin Heidelberg.
- Tømmerraas, K., Koping-Hoggard, M., Varum, K. M., Christensen, B. E., Artursson, P., & Smidsrød, O. (2002). Preparation and characterisation of chitosans with oligosaccharide branches. *Carbohydrate Research*, 337(24), 2455-2462.
- Tømmerraas, K., Strand, S. P., Christensen, B. E., Smidsrød, O., & Vårum, K. M. (2011). Preparation and characterization of branched chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1558-1564. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.008>
- Tømmerraas, K., Vårum, K. M., Christensen, B. E., & Smidsrød, O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydrate Research*, 333(2), 137-144. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00130-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00130-6)

Torchilin, V. P., & Papisov, M. I. (1994). Why do Polyethylene Glycol-Coated Liposomes Circulate So Long?: Molecular Mechanism of Liposome Steric Protection with Polyethylene Glycol: Role of Polymer Chain Flexibility. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 725-739. doi:10.3109/08982109409037068

Tripathi, S. K., Goyal, R., Kashyap, M. P., Pant, A. B., Haq, W., Kumar, P., & Gupta, K. C. (2012). Depolymerized chitosans functionalized with bPEI as carriers of nucleic acids and tuftsin-tethered conjugate for macrophage targeting. *Biomaterials*, 33(16), 4204-4219. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.02.035>

Upadhyaya, L., Singh, J., Agarwal, V., & Tewari, R. P. (2014). The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *Journal of Controlled Release*, 186, 54-87. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.043>

van de Wetering, P., Moret, E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., van Steenberg, M. J., & Hennink, W. E. (1999). Structure–Activity Relationships of Water-Soluble Cationic Methacrylate/Methacrylamide Polymers for Nonviral Gene Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 10(4), 589-597. doi:10.1021/bc980148w

van der Vlies, A. J., Hasegawa, U., & Hubbell, J. A. (2012). Reduction-Sensitive Tioguanine Prodrug Micelles. *Molecular Pharmaceutics*, 9(10), 2812-2818. doi:10.1021/mp3001183

Vårum, K. M., Ottøy, M. H., & Smidsrød, O. (2001). Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 89-98. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00288-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00288-5)

Verma, I. M., & Somia, N. (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*, 389(6648), 239-242.

Voets, I. K., de Keizer, A., & Cohen Stuart, M. A. (2009). Complex coacervate core micelles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 147–148(0), 300-318. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.012>

Vroman, L. (1964). EFFECTS OF HYDROPHOBIC SURFACES UPON BLOOD COAGULATION. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*, 10, 455-493.

Vroman, L., & Adams, A. L. (1969). Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces. *Surface Science*, 16(0), 438-446. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028\(69\)90037-5](http://dx.doi.org/10.1016/0039-6028(69)90037-5)

Vroman, L., Adams, A. L., Fischer, G. C., & Munoz, P. C. (1980). Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood*, 55(1), 156-159.

Walkey, C. D., & Chan, W. C. W. (2012). Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2780-2799. doi:10.1039/C1CS15233E

Wilson, H., Byrne, S., & Mullen, K. M. (2015). Dynamic Covalent Synthesis of Donor–Acceptor Interlocked Architectures in Solution and at the Solution:Surface Interface. *Chemistry – An Asian Journal*, 10(3), 715-721. doi:10.1002/asia.201403288

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949 Pt 1), 1465-1468.

Wuts, P. G. M., & Greene, T. W. (2006). Protection for the Carboxyl Group. Dans *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (p. 533-646): John Wiley & Sons, Inc.

Xiao, Y.-F. (2011). Cardiac arrhythmia and heart failure: From bench to bedside. *Journal of Geriatric Cardiology : JGC*, 8(3), 131-132. doi:10.3724/SP.J.1263.2011.00131

Yamaoka, T., Tabata, Y., & Ikada, Y. (1994). Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(4), 601-606.

Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., & McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), 9568-9572.

You, J., Hu, F. Q., Du, Y. Z., & Yuan, H. (2007). Polymeric micelles with glycolipid-like structure and multiple hydrophobic domains for mediating molecular target delivery of paclitaxel. *Biomacromolecules*, 8(8), 2450-2456. doi:10.1021/bm070365c

Zalipsky, S., & Harris, J. M. (1997). Introduction to Chemistry and Biological Applications of Poly(ethylene glycol). Dans *Poly(ethylene glycol)* (vol. 680, p. 1-13): American Chemical Society.

Zamboni, W. C., Torchilin, V., Patri, A. K., Hrkach, J., Stern, S., Lee, R., . . . Grodzinski, P. (2012). Best Practices in Cancer Nanotechnology: Perspective from NCI Nanotechnology Alliance. *Clinical Cancer Research*, 18(12), 3229-3241. doi:10.1158/1078-0432.ccr-11-2938

Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Arzumanov, A. A., Romanova, E. A., Gait, M. J., & Oretskaya, T. S. (2002). Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates with single and multiple peptides attached to 2'-aldehydes through thiazolidine, oxime, and hydrazine linkages. *Bioconjugate Chemistry*, 13(4), 822-830.

Zervas, L., Photaki, I., & Ghelis, N. (1963). On Cysteine and Cystein Peptides. II. S-Acylcysteines in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 85(9), 1337-1341. doi:10.1021/ja00892a027

Zhang, B., Cho, M., Fortner, J. D., Lee, J., Huang, C.-H., Hughes, J. B., & Kim, J.-H. (2009). Delineating Oxidative Processes of Aqueous C60 Preparations: Role of THF Peroxide. *Environmental Science & Technology*, 43(1), 108-113. doi:10.1021/es8019066

Zhang, C., Ping, Q., Ding, Y., Cheng, Y., & Shen, J. (2004). Synthesis, characterization, and microsphere formation of galactosylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 91(1), 659-665. doi:10.1002/app.13232

Zhang, T., & Marchant, R. E. (1994). Novel Polysaccharide Surfactants: Synthesis of Model Compounds and Dextran-Based Surfactants. *Macromolecules*, 27(25), 7302-7308. doi:10.1021/ma00103a011

ANNEXE A- LISTE NON –EXHAUSTIVE DES DIFFÉRENTES VOIES D’ADMINISTRATION POUR LA LIVRAISON DE GÈNES MÉDICAMENTS.

Méthodes		Voies d’administration	Avantages	Limitations	Exemples
PHYSIQUES	Injection d’ADN nu	Intratissulaire	Simple et sans danger	Faible efficacité	Injection directe de pDNA dans le muscle (Wolff <i>et al.</i> , 1990)
	Gene gun	Topique	Bonne efficacité	Détérioration des tissus à l’endroit de l’injection	Nanoparticules d’or couvertes de pDNA (Yang <i>et al.</i> , 1990)
	Électroporation	Topique, Intratissulaire	Haute efficacité	Nécessite une intervention chirurgicale pour les tissus profonds	Insertion d’électrodes dans les tissus considérés (Heller <i>et al.</i> , 2005)
	Hydrodynamique	Systémique, Intravasculaire	Haute efficacité pour la livraison dans le foie Simple	Efficace chez les petits animaux, Intervention chirurgicale nécessaire pour livraison locale	Administration systémique de pDNA chez l’animal (Liu, F. <i>et al.</i> , 1999)
	Ultrasons	Topique, Systémique	Bon potentiel pour la livraison locale	Faible efficacité <i>in vivo</i> , Taille de l’ADN	pDNA <i>in vitro</i> (Liang <i>et al.</i> , 2004)
BIOLOGIQUES	Rétrovirus	Topique, Intratissulaire, Systémique	Haute efficacité	Immunogène, Taille de l’ADN (7kb)	Matrice du HIV-1 (Bukrinsky <i>et al.</i> , 1993)
	Adénovirus	Topique, Intratissulaire, Systémique	Haute efficacité; taille de l’ADN (30kb)	Immunogène	HD-Ad (Cao <i>et al.</i> , 2011)
	Virus adéno-associés	Topique, Intratissulaire, Systémique	Haute efficacité, moins immunogène	Taille de l’ADN (30kb)	AAV-5 (Hirsch <i>et al.</i> , 2010)
CHIMIQUES	Lipides cationiques	Topique, Intratissulaire, Systémique, Inhalation	Haute efficacité <i>in vitro</i>	Immunogène, Efficacité limitée <i>in vivo</i>	DOTAP (Hirsch <i>et al.</i> , 2010), Lipofectamine™ (DOSPA) (Stamatatos <i>et al.</i> , 1988)
	Polymères cationiques	Topique, Intratissulaire, Systémique, Inhalation	Haute efficacité <i>in vitro</i>	Cytotoxique, Immunogène dans certains cas	Cf. Tableau 2.1
	Hybrides Lipides/Polymères	Topique, Intratissulaire, Systémique, Inhalation	Faible toxicité, haute efficacité <i>in vitro</i>	Activité moyenne <i>in vivo</i>	SNALP (Rossi, 2005)

ANNEXE B – ARTICLE 1 : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Pickenhahn, V. D., Darras, V., Dziopa, F., Biniecki, K., De Crescenzo, G., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. (2015). Regioselective thioacetylation of chitosan end-groups for nanoparticle gene delivery systems. *Chemical Science*, 6, 4650–4664. <http://doi.org/10.1039/C5SC00038F>

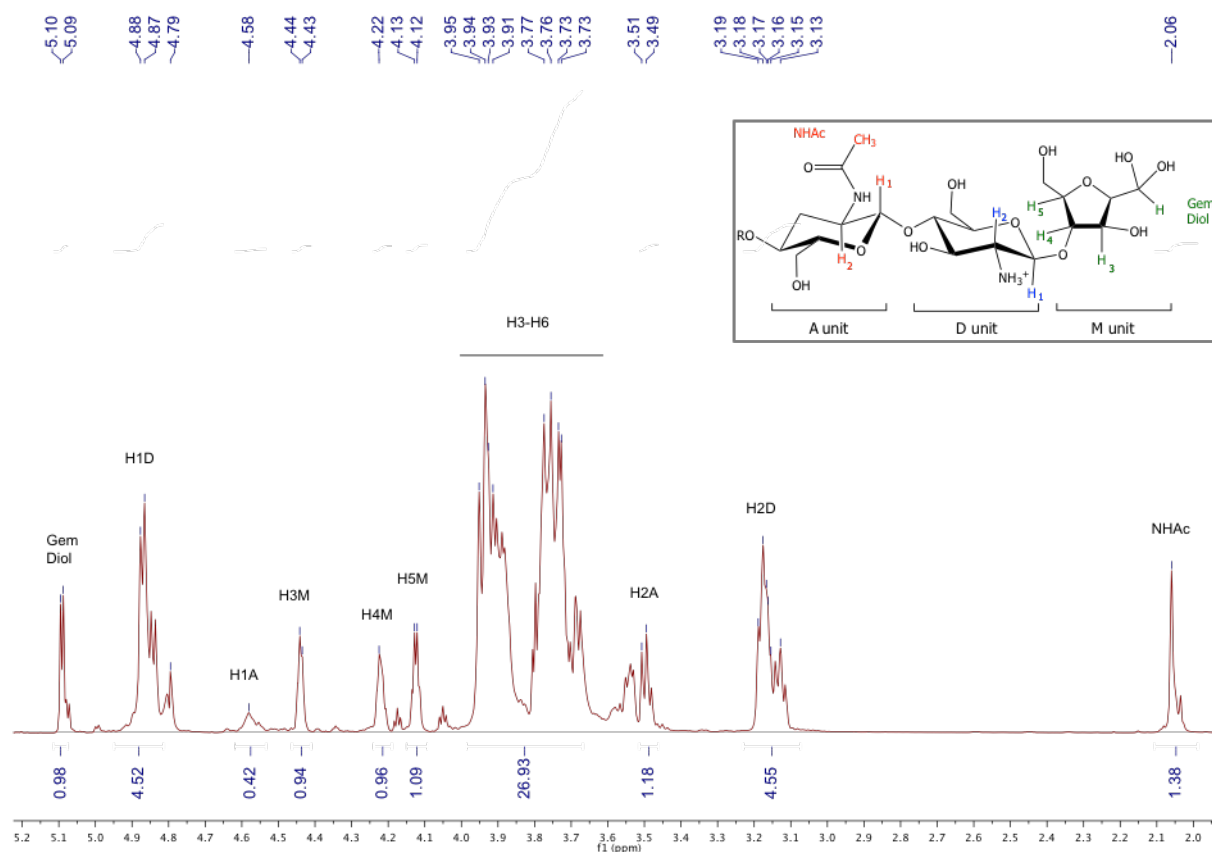


Figure 7.3 : ^1H NMR spectrum of the CS 92-1 depolymerization medium ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (50 mM), $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 2000, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). No aldehyde proton peak was observed around 8-10 ppm, the hydrated *gem*-diol form remaining predominant.

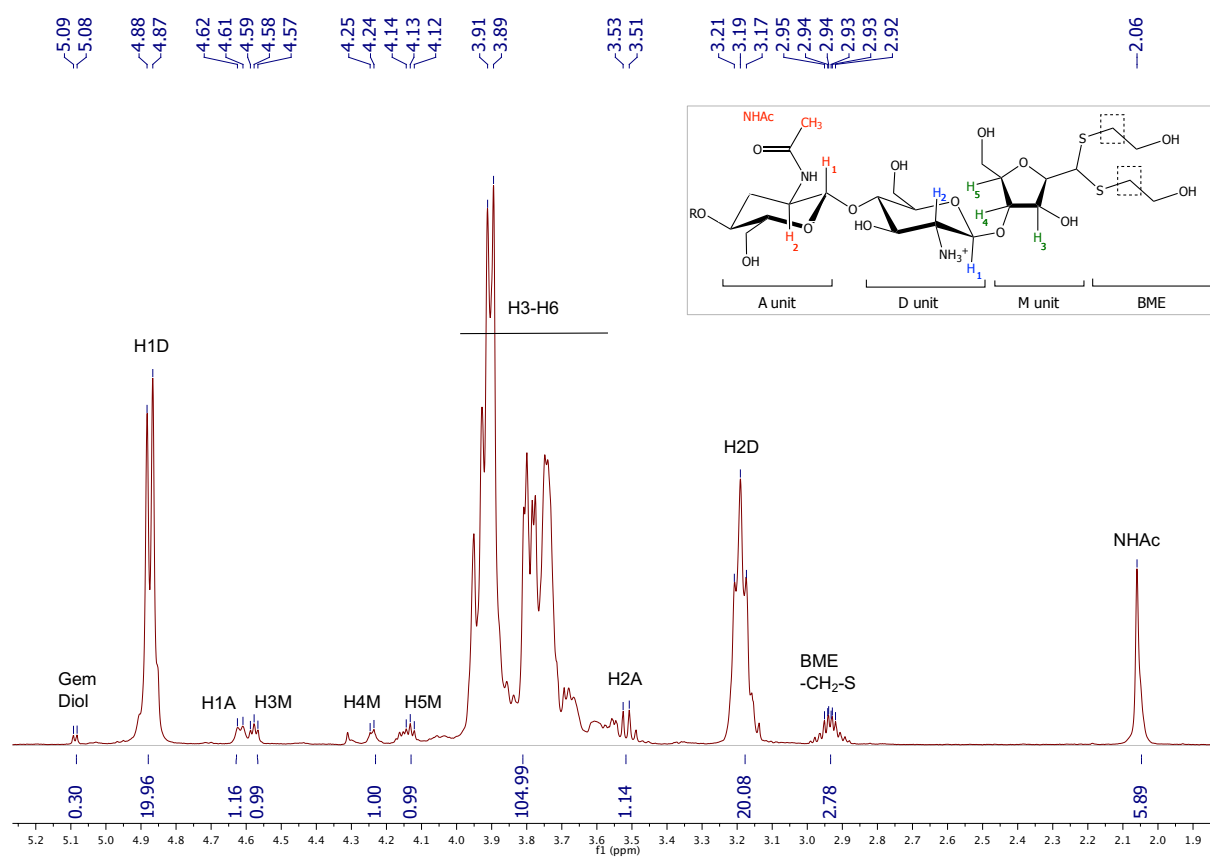


Figure 7.4 : ^1H NMR spectrum of the CS-BME product after workup II ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$, $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). Integration of BME ($-\text{CH}_2\text{-S}-$) protons peaks was used to calculate the functionalization degree ($F=70\%$ in this particular case, according to Eqn (2)).

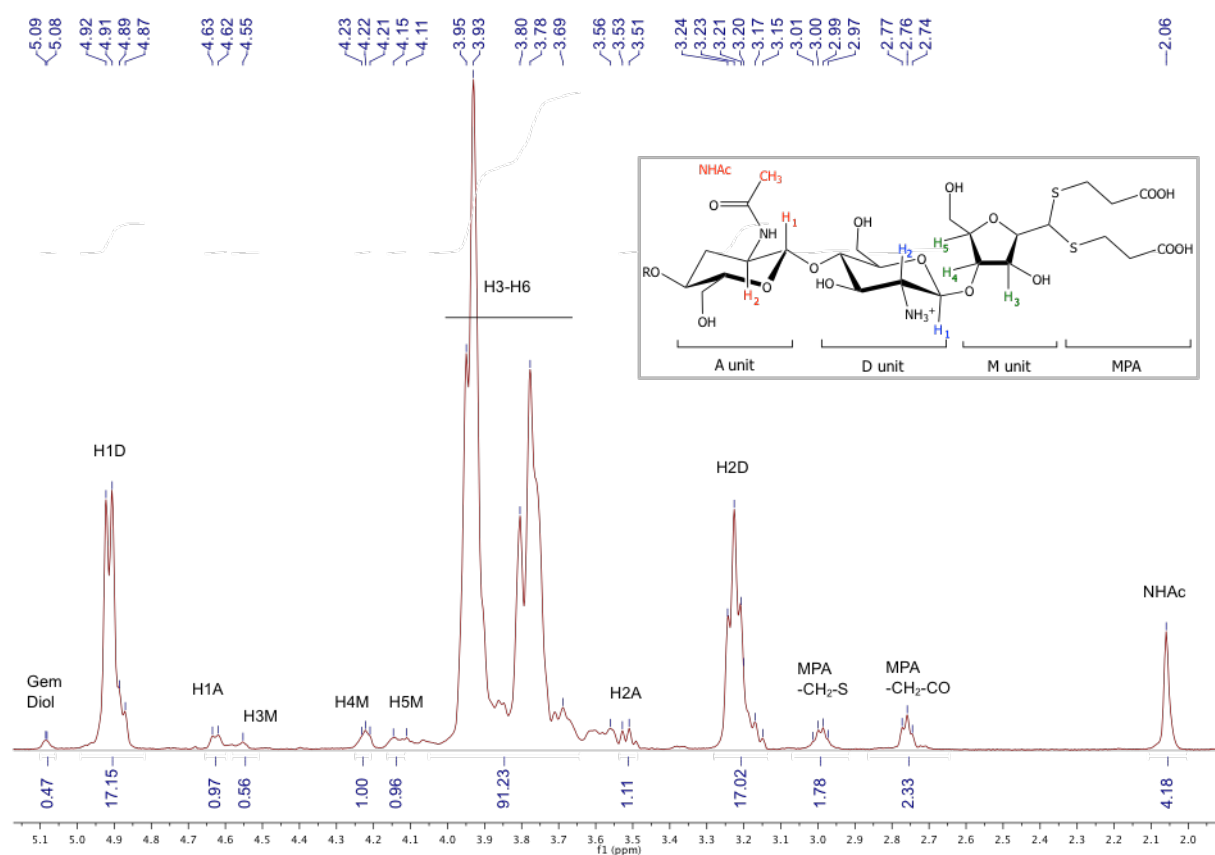


Figure 7.5 : ^1H NMR spectrum of the CS-MPA product after workup II ($\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$, $T=70^\circ\text{C}$, HOD peak was presaturated, number of scans (ns) = 64, relaxation period (d1) = 6s, Acquisition time=2s, Exponential apodization = 1 Hz). Integration of MPA protons peaks was used to calculate the functionalization degree ($F=52\%$ in this particular case, according to Eqn (3)).

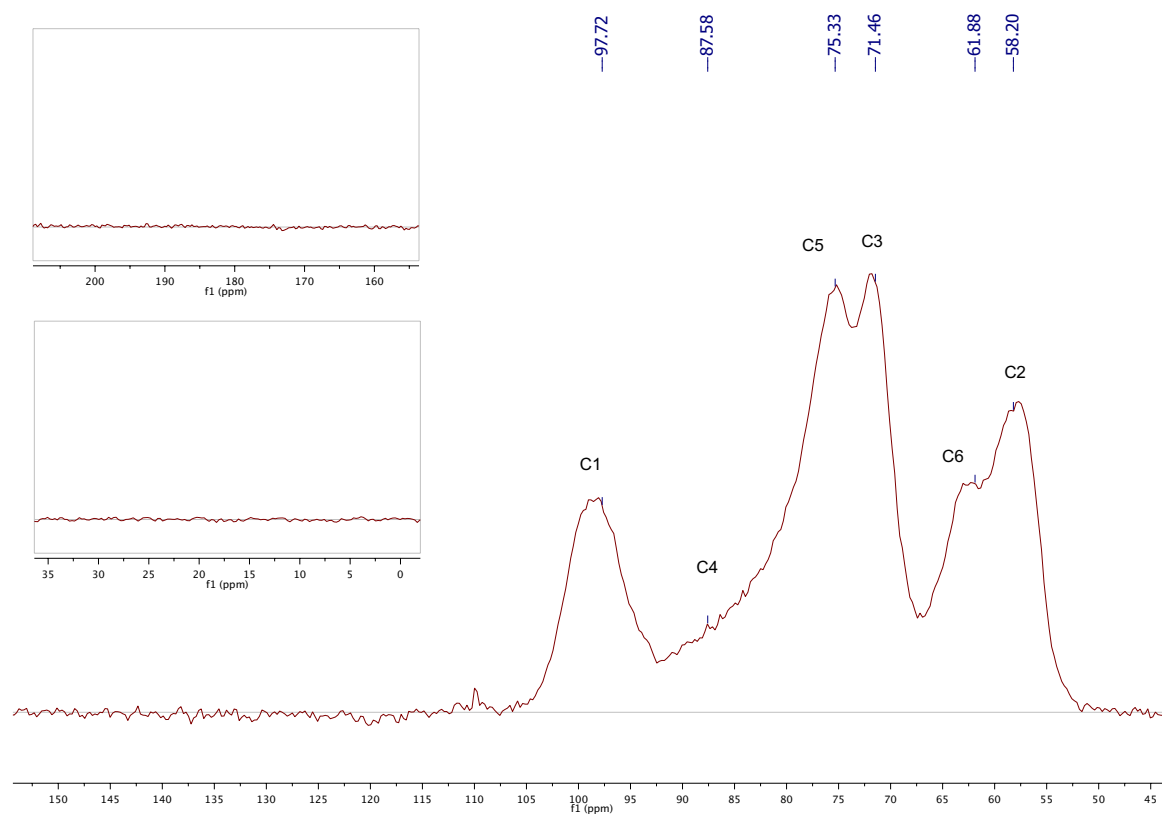


Figure 7.6 : ^{13}C solid state NMR (CP-MAS) of an extra-dried CS 99-1 salt. The sample preparation as well as the analysis was performed under inert atmosphere (N_2) to avoid contact with water content in air. ($T=25^\circ\text{C}$, $t=6\text{h}$, $\nu=12\text{kHz}$).

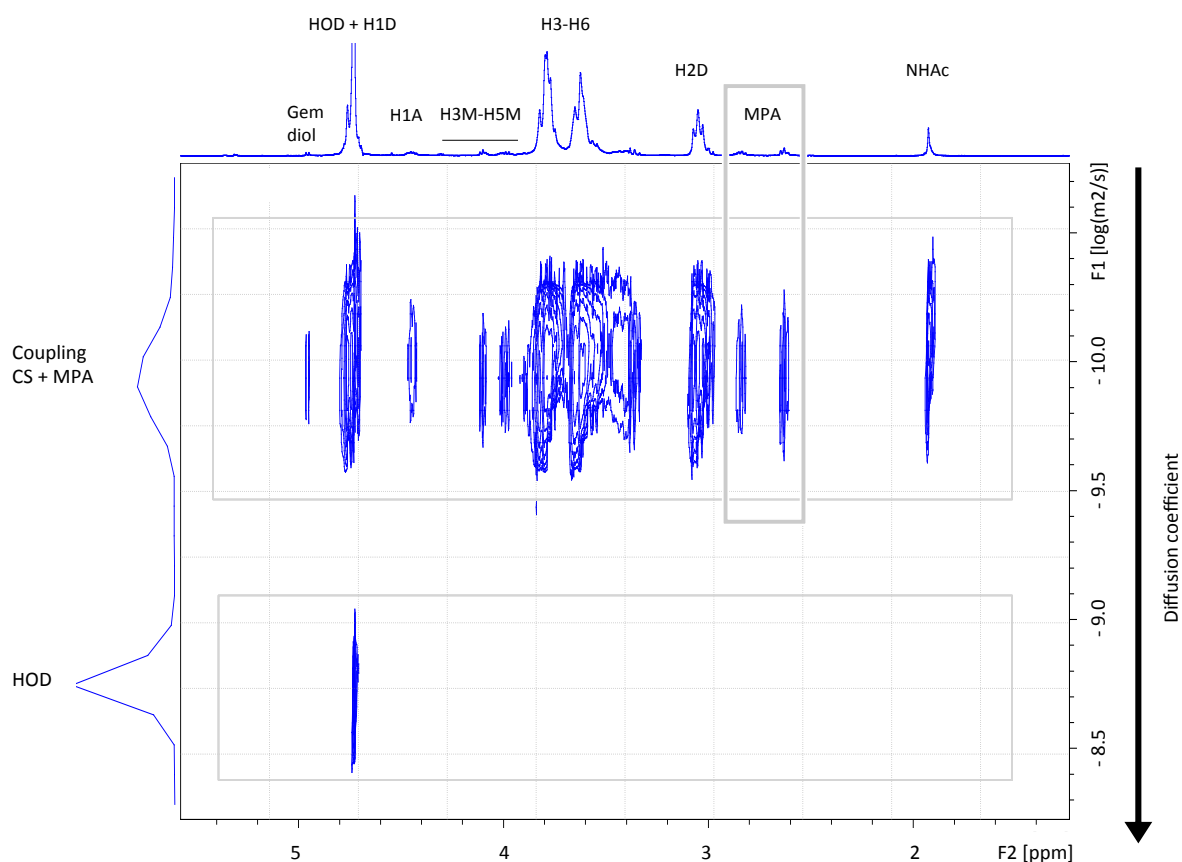


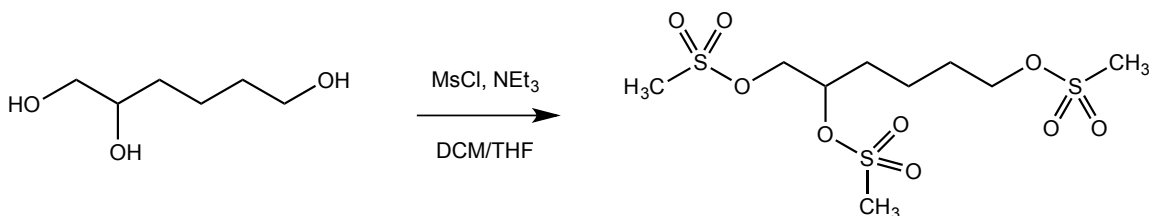
Figure 7.7 : DOSY spectrum of the CS HCl salt M-Unit conjugated to MPA. 32 gradients between 11.2 and 358.4 gauss.cm⁻¹ with a gradient pulse (δ) of 1 ms, a diffusion time (Δ) of 60 ms. Both CS and MPA have the same translational diffusion coefficient at 25°C in 2% DCl in D₂O.

ANNEXE C - ARTICLE 2 : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Each chemical reaction described in the following sections was performed on at least 3 independent occasions ($N \geq 3$). Fresh reactants, as well as Ar degassed double deionized water and solvents, were used to minimize disulfide bond formation.

Section 1: Triskelion linker synthesis: Hexane-1,2,6-trithiol

2-[(methylsulfonyl)oxy]hexane-1,6-diyl dimethanesulfonate synthesis:



The triol starting material (Hexane-1,2,6-triol, $m = 1.74$ g, $n_{\text{OH}} = 3.89 \cdot 10^{-2}$ mol) was dissolved in 40 mL anhydrous dichloromethane (DCM) + 20 mL anhydrous Tetrahydrofuran (THF) ($c_{\text{OH}} = 650$ mM). Mesylate chloride (MsCl, 3 equivalents per hydroxyl group, $n = 1.71 \cdot 10^{-1}$ mol; $v = 9.04$ mL) was added stepwise to the stirring reaction medium. While stirring, the clear and homogeneous reaction medium was cooled down to 0-5°C within an ice bath and $v = 16.6$ mL triethylamine (NEt₃, 3 equivalents per hydroxyl group, $n = 1.71 \cdot 10^{-1}$ mol) was added. The reaction mixture was gently warmed up to room temperature and stirred for 24h under inert atmosphere. Heterogeneous and dark-orange reaction mixture was dissolved in $v = 3 \times 100$ mL DCM and the organic bottom layer was successively extracted with 2 x 100 mL cold ddH₂O, 2 x 100 mL 10% v/v HCl solution, 2 x 100 mL saturated Na₂CO₃ solution and $v = 100$ mL saturated NaCl solution. Remaining organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to give an orange oil with 93% yield that was analyzed by TLC, NMR and MS-ESI. This compound was engaged without further purification in the second step of the synthesis.

TLC: $R_f = 0.3$, Ethyl acetate/Cyclohexane [7:3]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 22°C , ns=32, d1=2s, acquisition time=2s): δ 1.49-1.72 (m, 6H, -(CH₂)₃-), 2.92-3.01 (3 s, 3x3H, -(S-CH₃)₃), 4.13-4.32 (m, 2x2H, -CH₂-O-), 4.78-4.80 (m, 1H, -CH-O-)

^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 , 22°C , ns=320, d1=1.5s, acquisition time=2s): δ 21.00, 28.61 (-CH₂); 30.49 (-CH₂-CH-); 37.53, 37.86, 38.89 (SO₂-CH₃); 69.40, 69.54 (-CH₂-O); 78.62 (-CH).

MS-ESI: $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 386.06226$ (386.06077 expected); $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 391.01738$ (391.01617 expected); $[\text{M}+\text{K}]^+ = 406.99055$ (406.99010 expected).

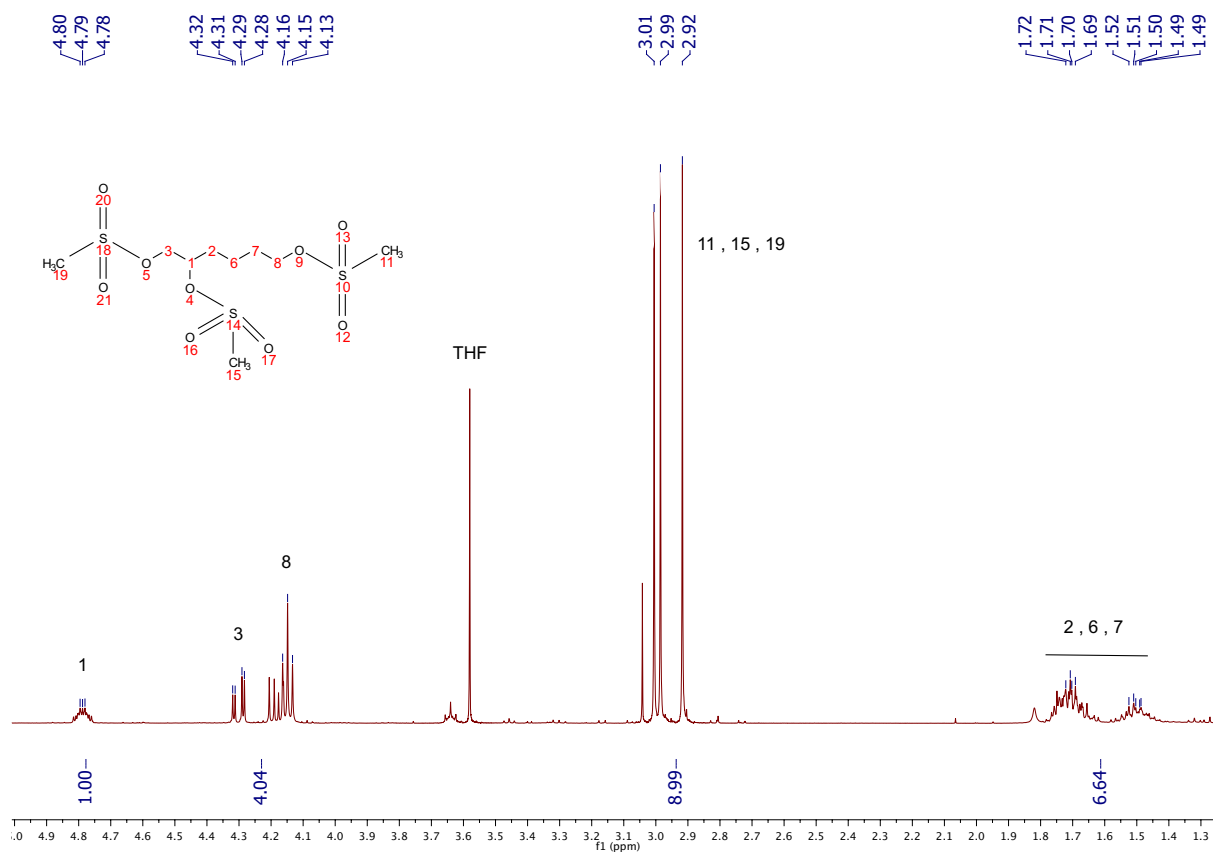
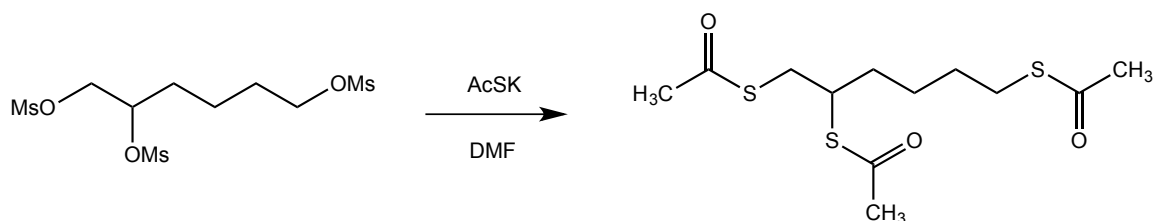


Figure 7.8 : ^1H NMR, 400 MHz, CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s.

S,S',S''-hexane-1,2,6-triyl triethanethioate synthesis:

The mesylate intermediate ($m = 4.78$ g, $n_{\text{OMs}} = 3.89 \cdot 10^{-2}$ mol) was dissolved in $v = 83$ mL anhydrous DMF ($c_{\text{OMs}} = 467$ mM). The clear orange solution was degassed with 3 cycles vacuum/N₂ and was cooled down to 0-5°C within an ice-bath for 15 min. Potassium thioacetate ($m = 22.2$ g, 5 equivalents per -OMs group) was added stepwise to the stirring and cold reaction medium under inert atmosphere. The first 8h of reaction were done at 0-5°C and the mixture stirred at room temperature for an additional 16h. The red-brown reaction medium was concentrated to dryness and was solubilized in $v = 3 \times 200$ mL cyclohexane. The organic layer was extracted with 5×200 mL ddH₂O, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The crude oil was purified by flash-chromatography using Cyclohexane/Ethyl acetate [95:5] as eluent, giving $m = 2.25$ g of acetylated Triskelion linker with 75% yield. The Triskelion linker is stored under its acetyl-protected form to avoid disulfide bonds formation and will be deprotected right before conjugation.

TLC: $R_f = 0.3$, Cyclohexane/Ethyl acetate [9:1].

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 22°C, $n_s = 32$, $d_1 = 2$ s, acquisition time = 2 s): δ 1.36-1.73 (m, 6H, -(CH₂)₃-), 2.32-2.34 (3 s, 3x3H, -(CO-CH₃)₃), 2.82-2.86 (t, 2H, -CH₂-CH₂-S-), 3.09-3.25 (m, 2H, -CH-CH₂-S), 3.59-3.65 (m, 1H, -CH-S-).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃, 22°C, $n_s = 320$, $d_1 = 1.5$ s, acquisition time = 2 s): δ 25.80, 28.62, 28.96 (-CH₂-); 30.36, 30.46, 30.55 (-CH₃-); 32.51 (-CH-CH₂-S-); 33.84 (-CH₂-CH-); 43.91 (-CH-); 194.67, 194.79, 195.67 (CO).

MS-ESI: $[M+H]^+ = 309.06526$ (309.06473 expected); $[M+NH_4]^+ = 326.09217$ (326.09128 expected); $[M+Na]^+ = 331.04745$ (331.04668 expected); $[M+K]^+ = 347.02041$ (347.02062 expected).

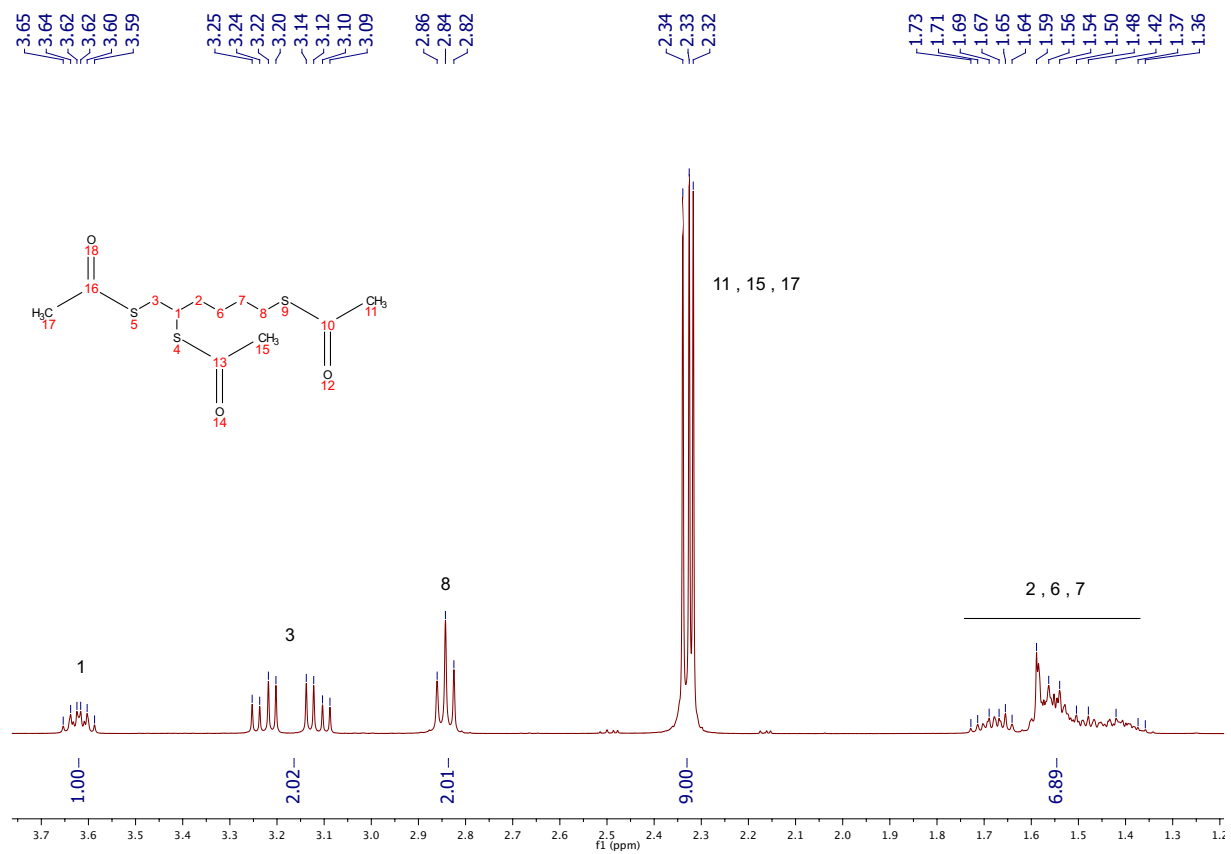
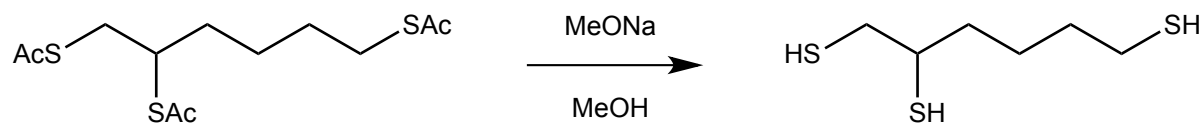


Figure 7.9 : ^1H NMR, 400 MHz, CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s.

Hexane-1,2,6-trithiol synthesis:

The acetyl-protected Triskelion linker ($m = 100.0$ mg, $n_{\text{SAc}} = 9.73 \cdot 10^{-4}$ mol) was dissolved in $v = 2.9$ mL of degassed 0.5M sodium methoxide solution (MeONa in MeOH, 1.5 equivalents per acetyl group to cleave). The reaction medium stirred for 10 min at room temperature and under inert atmosphere. Reaction medium was quenched with $v = 241$ μL of degassed HCl 37% (2 equivalents per MeONa) and the heterogeneous solution was then extracted with $v = 4$ mL of degassed ddH₂O. The isolated organic layer was carefully concentrated under reduced pressure to give the pure product as a clear yellowish oil with 95% yield.

TLC: $R_f=0.7$, Cyclohexane/Ethyl acetate [4:1].

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 22°C, $n_s=32$, $d1=2s$, acquisition time=2s): δ 1.35 (m, 1H, -SH-), 1.50-1.69 (br., 6H, -(CH₂)₃-), 1.79-1.86 (m, 2H, -SH-), 2.53-2.55 (m, 2H, -CH₂-S), 2.68-2.83 (m, 2H, -CH-CH₂-SH), 2.88-2.90 (m, 1H, -CH-S-).

¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃, 22°C, $n_s=320$, $d1=1.5s$, acquisition time=2s): δ 24.06 (-CH₂-SH); 25.97, 30.08, 33.64 (-CH₂-); 34.06 (-CH-CH₂-SH); 54.84 (-CH₂-CH-CH₂-).

MS-ESI: $[M+H]^+ = 183.0342$ (183.0330 expected); $[M+Na]^+ = 205.0175$ (205.0149 expected).

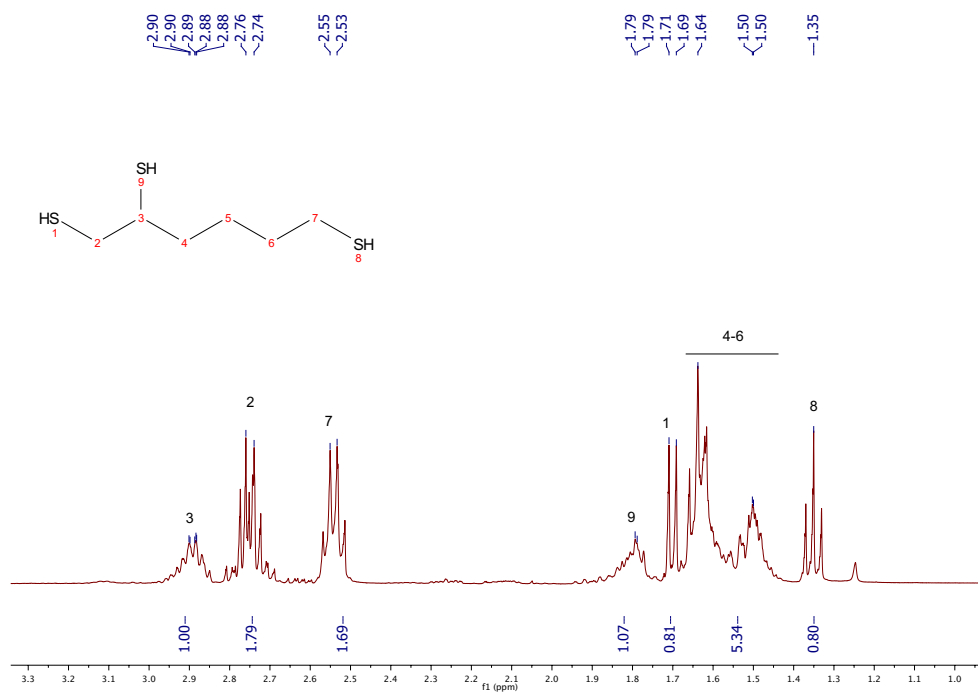


Figure 7.10 : ¹H NMR, 400 MHz, CDCl₃, T=25°C, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=2s.

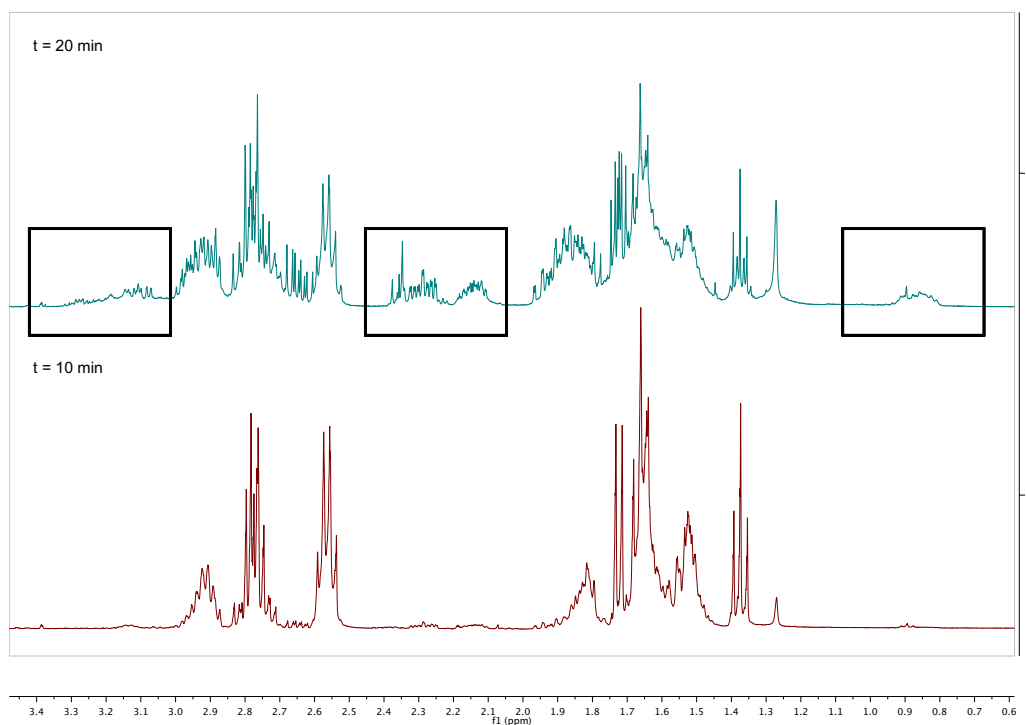


Figure 7.11 : Stacked ¹H NMR spectra representing the Triskelion linker decomposition which occurs upon longer sodium methoxide deprotection duration (t = 10 min vs. t = 20 min).

Section 2: 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) / Thiol-hook molecules conjugation

2,5-anhydro-D-mannose synthesis:

The 2,5-anhydro-D-mannose synthesis described therein was inspired from the work of Claustre *et al.* (Claustre *et al.*, 1999), with some slight modifications. Briefly, D-(+)-glucosamine hydrochloride ($\text{GlcNH}_3^+\text{Cl}^-$, 1185 mg, $5.50 \cdot 10^{-3}$ mol) was dissolved in 25 mL double deionized water (ddH_2O). Glucosamine solution was acidified with 10 g Dowex [H^+] beads and the heterogeneous reaction medium was cooled down to 5°C . After 15 min stirring, sodium nitrite (NaNO_2 , 1780 mg, $2.75 \cdot 10^{-2}$ mol, 5 equivalents/glucosamine) was added by portions and the reaction medium stirred overnight at 50°C . TLC (EtOAc/MeOH [4:1]) of the crude reaction medium confirmed the complete conversion of $\text{GlcNH}_3^+\text{Cl}^-$ into the desired product ($R_f=0.4$). Heterogeneous medium was filtered through glass filter and the beads were rinsed with 10 mL ddH_2O . The filtrate was carefully treated with 12 g Dowex [HCO_3^-] in order to increase the pH up to 6.5. This solution was filtered on glass filter and the filtrate was flash-frozen and freeze-dried.

^1H NMR (400 MHz, D_2O , 25°C , ns=32, d1=6s, acquisition time=2s) δ 3.67-3.81 (m, 3H, H4 & H6), 3.91-3.94 (dd, $J=9.0, 5.9$ Hz, 1H, H5), 4.05-4.08 (t, $J=5.6$ Hz, 1H, H2), 4.18-4.21 (t, $J=5.7$ Hz, 1H, H3), 5.09-5.10 (d, $J=5.4$ Hz, 0.87H, H1 Gem-diol), 8.46 (s, 0.14H, H1 Aldehyde).

^{13}C NMR (400 MHz, D_2O , 25°C , ns=320, d1=1.5s, acquisition time=2s) δ 60.86 (C6), 76.47 (C4), 77.39 (C3), 82.85 (C2), 84.21 (C5), 89.62 (C1).

MS(ESI+): Aldehyde form $[\text{M}+\text{H}^+] = 163.0601$; $[\text{M}+\text{Na}^+] = 185.0428$ (Expected: $[\text{M}+\text{H}^+] = 163.0601$; $[\text{M}+\text{Na}^+] = 185.0420$); Gem-diol-form $[\text{M}+\text{Na}^+] = 203.0538$ (Expected: 203.0526).

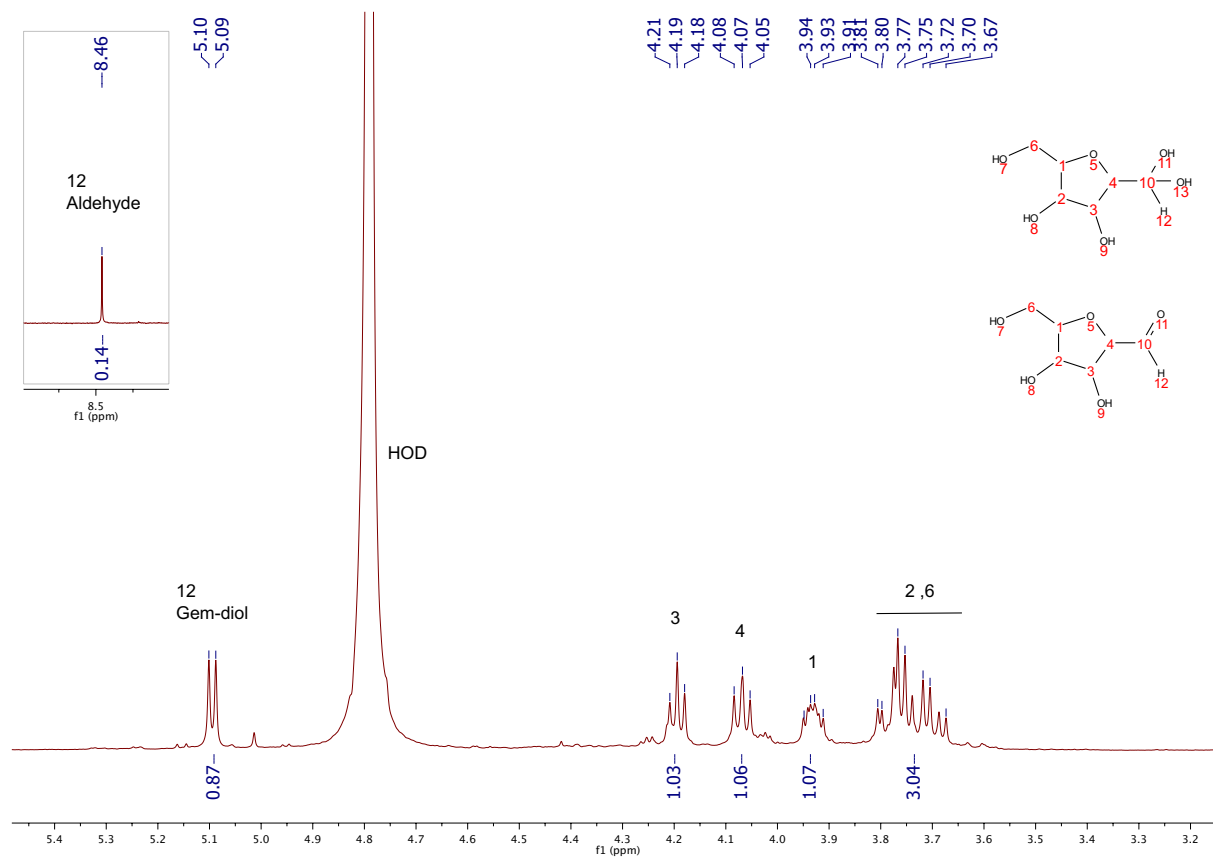
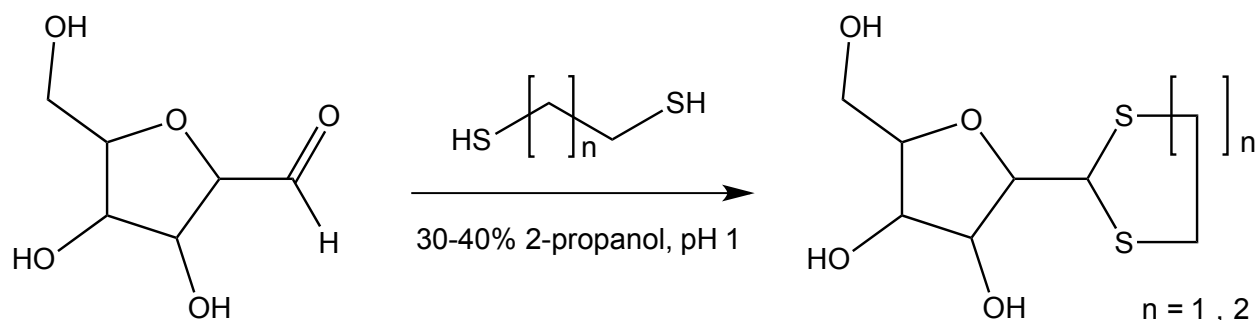


Figure 7.12 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=25^\circ\text{C}$, ns=32 scans, acquisition time=2s, d1=6s.

2,5-anhydro-D-mannose / Thiol-hook molecules conjugation: LC-MS Mechanistic studies:



Molecules bearing a thiol-hook (Ethanedithiol, EDT and Propanedithiol, PDT) were used to assess the intramolecular thioacetylation process, where both thiol attacks occur simultaneously on the M-Unit aldehyde forming instantaneously the stable thioacetal conjugate. Briefly, the synthesized 2,5-anhydro-D-mannose M-Unit (0.1 mmol, 16.2 mg) was dissolved in 5mL degassed 30 or 40 % v/v 2-propanol in ddH₂O for EDT or PDT coupling, respectively. The pH of the solution was adjusted to 1 with 3M HCl solution prior to the addition of the thiol-bearing molecule (0.5 mmol, 41.9 μ L for EDT and 50.2 μ L for PDT). The reaction mixture was stirred for 72h at 50°C, under Ar atmosphere and covered with aluminum foil. The reaction mixture turned clear pink-orange after 72h and was split into 2 parts (Methods I and II): the first Method (Method I) was dedicated to the direct LC-MS analysis of the reaction medium in order to determine the thioacetal proportion in resulting conjugates that was formed *in situ*; whereas the second one (Method II) was immediately flash-frozen and then freeze-dried prior to LC-MS analyses to assess the effect of drying on the thioacetal proportion in resulting conjugates and to ascertain that no by-products appear post concentration. Only one product was detected by LC-MS, namely the corresponding stable thioacetal formed by intramolecular cyclization, independently from both the thiol-hook molecule engaged and the Method used post-reaction. No linear thioacetals were observed using the thiol-hook molecules and no hemithioacetal intermediates were detected for all experiments performed ($N \geq 3$ for each condition tested).

MS(ESI⁺): EDT conjugates $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 261.0215$ (Expected: 261.0226); PDT conjugates $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 275.0374$ (Expected: 275.0382).

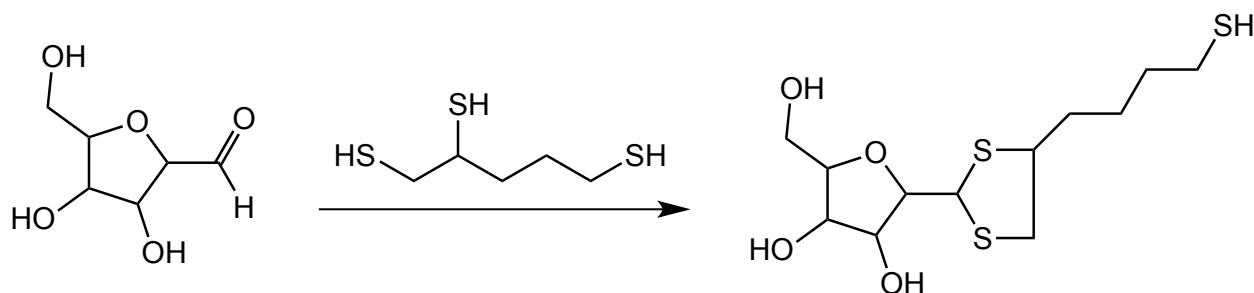
2,5-anhydro-D-mannose / Triskelion linker conjugation: Mechanistic studies by LCMS:

The conjugation of the acetyl-protected Triskelion linker to the 2,5-anhydro-D-mannose (M-Unit) was performed in a 2-steps process. Briefly, the acetyl-protected Triskelion was first deprotected using sodium methoxide (MeONa) treatment right before conjugation in order to minimize Triskelion linker disulfide linkage formation. In a second step, M-Unit that was synthesized by HONO treatment of glucosamine was dissolved in an appropriate mixture of solvents (30% THF v/v in ddH₂O or 90% methanol v/v in ddH₂O to reach 20 or 10 mM aldehyde concentration at pH 1, respectively). This solution was added to the deprotected Triskelion and the reaction medium was allowed to stir for 72h under inert atmosphere at T=50°C. Reaction medium was treated according to the following methods prior to LCMS analysis: Method I refers to a direct LC-MS analysis of the reaction medium whereas Method II stands for a concentration to dryness step prior LC-MS.

Triskelion linker deprotection :

The amount of Triskelion linker was set to 20 equivalents per 2,5-anhydro-D-mannose aldehyde engaged in the conjugation process. The acetyl-protected Triskelion linker was deprotected as described in section 0.

M-Unit / Triskelion linker conjugation :



Triskelion linker conjugation (30% THF): The following description corresponds to the conjugation performed in a degassed mixture of 30% v/v THF in ddH₂O. The 2,5-anhydro-D-mannose ($m = 5$ mg, $n = 2.78 \cdot 10^{-5}$ mol) was dissolved in 960 μ L of degassed ddH₂O and then $v = 416$ μ L of degassed THF was added. The pH of the reaction medium was adjusted to 1 with $v = 11$

μL of degassed HCl 37%, reaching a final aldehyde concentration of 20 mM. This solution was added to the deprotected Triskelion and the reaction medium was stirred for 72h at $T=50^{\circ}\text{C}$ under inert atmosphere.

Triskelion linker conjugation (90% MeOH): The following description corresponds to the conjugation performed in a degassed mixture of 90% v/v Methanol in ddH₂O. The 2,5-anhydro-D-mannose ($m = 5 \text{ mg}$, $n = 2.78 \cdot 10^{-5} \text{ mol}$) was dissolved in 255 μL of degassed ddH₂O and then $v = 2498 \mu\text{L}$ of degassed methanol was added. The pH of the reaction medium was adjusted to 1 with $v = 23 \mu\text{L}$ of degassed HCl 37%, reaching a final aldehyde concentration of 10 mM. This solution was added to the deprotected Triskelion and the reaction medium was stirred for 72h at $T=50^{\circ}\text{C}$ under inert atmosphere.

Reaction media were treated according to the methods described above prior to LCMS analysis.

Section 3: M-Unit chitosan (CS) salts / Thiol-hook molecules conjugation

M-Unit CS 92-4 HCl salt / Ethanedithiol conjugation:

Reaction 1 (30% 2-propanol, EDT 5 equivalents): CS 92-4 HCl salt ($M_n = 4030$ g/mol, 356.7 mg, 0.089 mmol aldehyde) was dissolved in a degassed mixture of 4.43 mL 30% v/v 2-propanol in ddH₂O ($c_{\text{aldehyde}} = 20$ mM). The pH of the homogeneous reaction medium was adjusted to 1 with degassed 3M HCl solution. This solution was divided into 3 equal volumes of $v = 1477$ μL (0.03 mmol aldehyde) and each of those was treated with $v = 12.4$ μL ethanedithiol (EDT; 5 equivalents per aldehyde, $n = 0.148$ mmol). Reaction media were stirred for 72h at $T=50^\circ\text{C}$, under inert atmosphere.

Reaction 2 (30% 2-propanol, EDT 20 equivalents): CS 92-2 HCl salt ($M_n = 4030$ g/mol, 70.0 mg, 0.017 mmol aldehyde) was dissolved in a degassed mixture of 0.87 mL 30% v/v 2-propanol in ddH₂O ($c_{\text{aldehyde}} = 20$ mM). The pH of the homogeneous reaction medium was adjusted to 1 with degassed 3M HCl solution. This homogeneous solution was treated with $v = 9.7$ μL ethanedithiol (EDT; 20 equivalents per aldehyde, $n = 0.116$ mmol) and was allowed to stir for 72h at $T=50^\circ\text{C}$, under inert atmosphere.

Workups and purification: All reaction media were divided into 2 equal volumes dedicated to Workup I (no freeze-drying) and Workup II (direct freeze-drying) and were treated as follows for comparison purposes. Workup I samples were directly engaged in the purification process, whereas Workup II samples were flash-frozen and freeze-dried prior to removal of unreacted thiol-bearing molecule. All reaction media were treated with 1N sodium hydroxide solution (pH of the solutions was increased up to 9) in order to remove some potential hemithioacetal intermediates (even if they were not observed by LCMS in the conditions implemented therein), ensuring that only the stable thioacetals conjugates would be quantified by ^1H NMR. After acidification of the solutions for chitosan solubilization, unreacted thiol molecules (EDT) were discarded by 5 successive reprecipitations in fresh 2-propanol. The remaining precipitates were dissolved in 5 mL ddH₂O and these solutions were flash-frozen and freeze-dried to give a white solid with 60-75% massic yield. Conjugation efficiencies were determined by ^1H NMR, using both Equations 1&2.

^1H NMR (400 MHz, D_2O , 70°C , ns = 64, d1 = 10s, acquisition time = 2s, HOD presaturation) δ 2.06 (s, 5.96H, NHAc), 3.20–3.23 (br, 22H, H2D), 3.36–3.37 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1.30H, EDT), 3.51–3.52 (d, $J=9.0\text{Hz}$, 1.36H, EDT), 3.75–3.93 (m, 125H, H3–H6), 4.13 (br, 1H, H5M), 4.22 (br, 1H, H4M), 4.87–4.92 (m, 22H, H1D), 5.08 (br, 0.33H, H1M gem-diol).

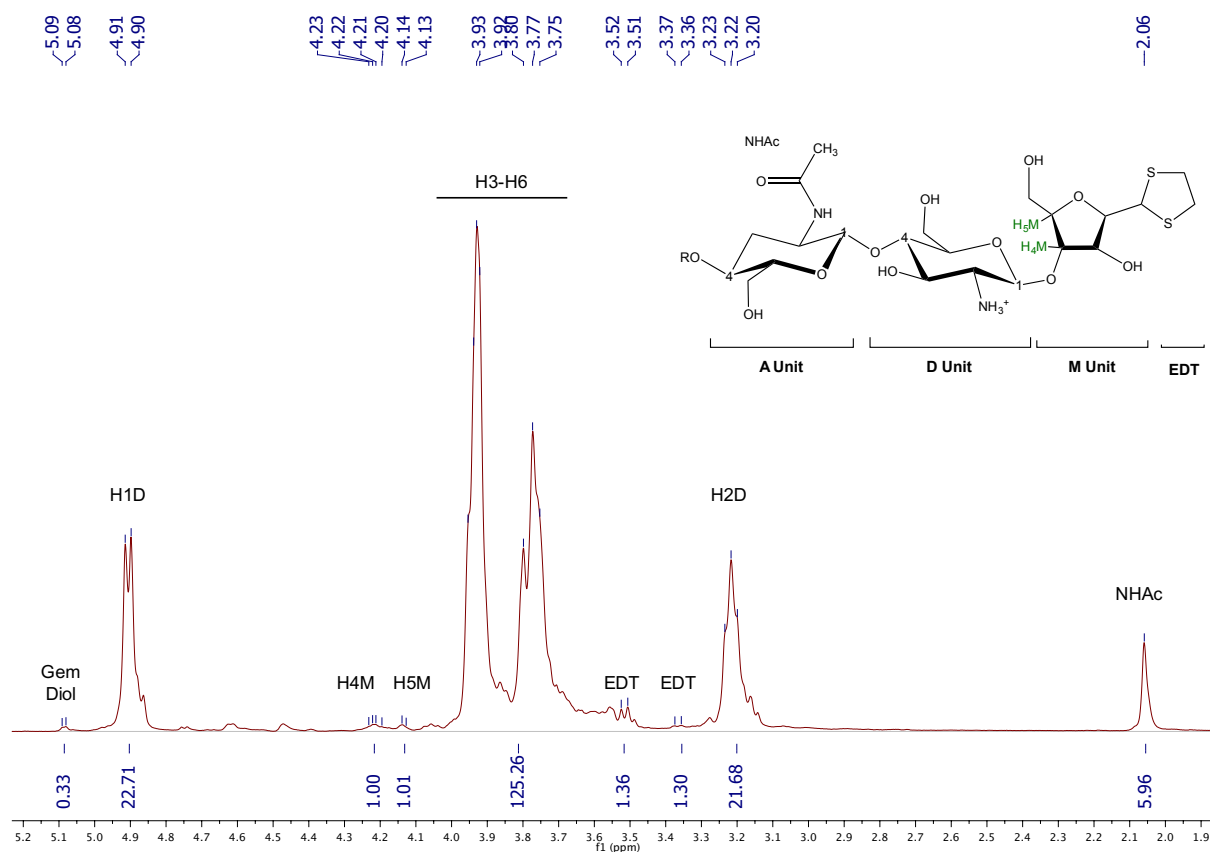


Figure 7.13 : ^1H NMR, 400 MHz, D_2O , $T=70^\circ\text{C}$, ns=64 scans, acquisition time=2s, d1=10s. Functionalization degree were calculated with Equations 1 and 2, giving $F = 67\%$.

M-Unit CS 92-2 HCl salt / Triskelion linker conjugation:

Step 1: Triskelion linker deprotection was performed as described above. The amount of Triskelion used in the following examples corresponds to 20 equivalents per chitosan's M-Unit aldehyde.

Step 2: Conjugation (2 kDa CS, 85% MeOH, pH 1, 24, 48 and 72h, Workup I&II: CS 92-2 HCl salt ($M_n = 3244$ g/mol, 76.7 mg, $2.36 \cdot 10^{-5}$ mol aldehyde) was dissolved in $v = 315$ μ L degassed ddH₂O. The pH of the homogeneous reaction medium was adjusted to 1 with $v = 39.4$ μ L degassed HCl 37%. Degassed methanol ($v = 2010$ μ L) was added to the chitosan acidic solution giving an 85% v/v methanol in ddH₂O mixture and reaching a chitosan end-group concentration of 10 mM. The protected Triskelion linker (20 equivalents per aldehyde, $n = 4.73 \cdot 10^{-4}$ mol, $m = 145.9$ mg) was deprotected and purified according to the protocol described above. Chitosan solution was added to the Triskelion oil and the reaction medium stirred for 24h, 48h and 72h at $T=50^\circ\text{C}$, under inert atmosphere. The reaction media corresponding to the time-points (24h, 48h and 72h) were treated with both Workups I&II described above giving a white solid with 65-75% massic yield. Conjugation efficiencies were determined by ^1H NMR, using both Equation 1 and Equation 2.

^1H NMR (400 MHz, D₂O, 70°C, ns = 64, d1 = 10s, acquisition time = 2s, HOD presaturation) δ 1.53-1.87 (br, 5.50H, Trisk 1-3), 2.06 (s, 6.40H, NHAc), 2.74-2.80 (br, 0.92H, Trisk 4), 3.14–3.18 (br, 16H, H2D), 3.66–3.96 (m, 81H, H3–H6), 4.13 (br, 1H, H5M), 4.22 (br, 1H, H4M), 5.08 (br, 0.08H, H1M gem-diol).

Section 4: PureCube Thiol-activated Magbeads / CS-b-Triskelion conjugation

The Thiol-activated Magnetic beads “brush-like” coating with CS-b-Triskelion 3-steps procedure is summarized in Figure 7.14.

Step 1: Since Thiol-activated Magbeads ($v = 1$ mL, $1.5 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ functional group density) needs to be freshly activated prior use, they were treated with a degassed solution of 50 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) in Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl for 20 min at room temperature, under inert atmosphere. Beads were rinsed twice with degassed Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl and were incubated overnight with a [1:4] degassed 50 mM sodium borate pH solution + 20 mM Aldrithiol-2 in degassed ethanol, at room temperature and under inert atmosphere. Beads were washed twice with degassed ethanol and twice with Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl. Supernatants were discarded but the beads were not allowed to dry until conjugation.

Step 2: After M-Unit CS aldehyde / Triskelion linker conjugation, CS-b-Triskelion within the crude CS mixture may have formed some disulfide linkages. A degassed 50 mM TCEP solution was prepared and CS mix ($m = 10$ mg, $F = 70\%$, $n_{\text{SH}} = 3 \mu\text{mol}$, $c = 10 \text{ mg.mL}^{-1}$) was reduced for 20 min at room temperature, under inert atmosphere. After complete reduction, reduced CS mix was filtered on Macrosep ultracentrifugal filter (Omega membrane, MWCO = 1 kDa), rinsed twice with a 0.1M degassed HCl solution and finally with Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl.

Step 3: Reduced CS mix solution (1 mL, 10 mg.mL^{-1}) from Step 2 was added on the freshly activated Magbeads (1 mL) and both species were allowed to react for 24-48h at room temperature, under inert atmosphere. Beads were rinsed twice with Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl to discard unreacted CS (supernatant was discarded) and then twice with 50 mM TCEP in Acetate buffer pH 4 + 200 mM NaCl. Combined supernatants were filtered on Macrosep ultracentrifugal filter (Omega membrane, MWCO = 1 kDa), rinsed twice with a 0.1M degassed HCl solution and finally with degassed ddH₂O. Clear colorless solution was flash-frozen and freeze-dried to afford the pure CS-b-Triskelion conjugate with 51% yield.

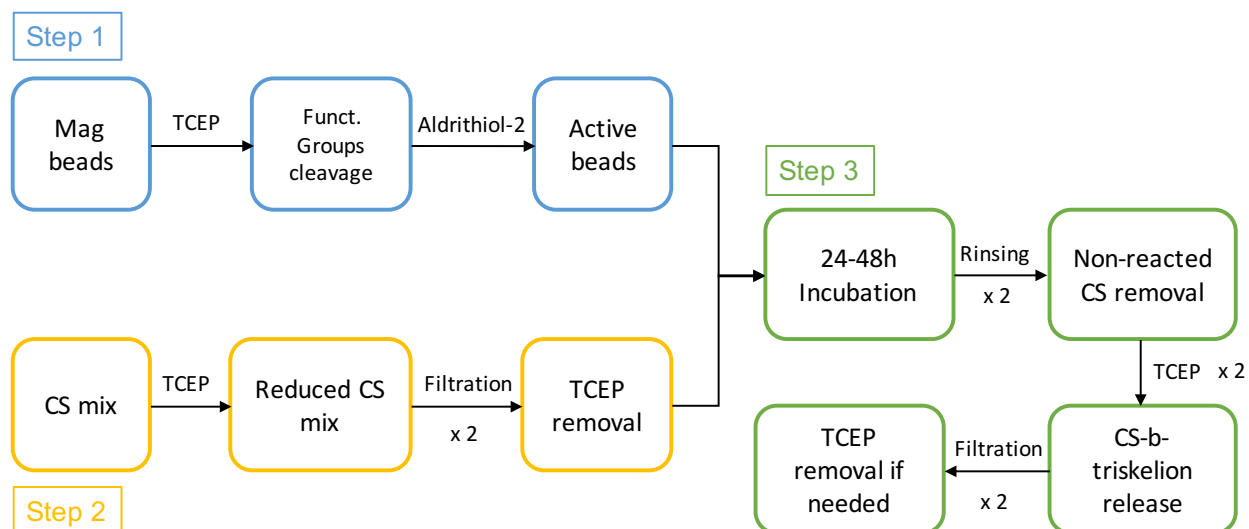


Figure 7.14 : Schematic representation of the Thiol-activated surface modification with CS-b-Triskelion 3-steps procedure. Step 1 refers to Thiol-activated Magbeads preparation, whereas Steps 2 and 3 refer to CS-b-Triskelion reduction and its conjugation onto beads surface, respectively.